

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del valor pronóstico de las células tumorales
circulantes y de la utilidad de su caracterización molecular
en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y
cuello en estadio avanzado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Cabezas Camarero

DIRECTORES

Eduardo Díaz-Rubio García

Javier Sastre Valera

Virginia de la Orden García

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LAS CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES Y DE LA UTILIDAD DE SU
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN PACIENTES CON
CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO
EN ESTADIO AVANZADO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Cabezas Camarero

DIRECTORES

Eduardo Díaz-Rubio García

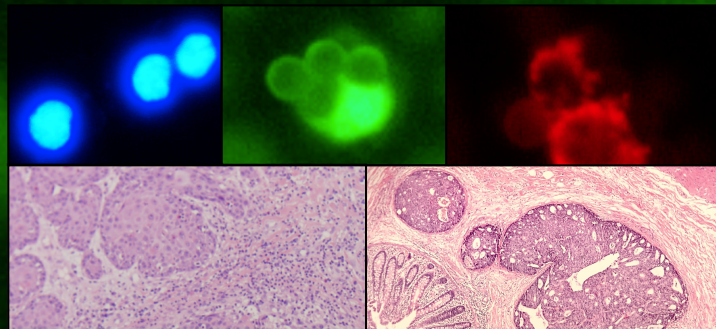
Javier Sastre Valera

Virginia de la Orden García

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LAS CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES Y DE LA UTILIDAD DE SU
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN PACIENTES CON
CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE CABEZA Y
CUELLO EN ESTADIO AVANZADO**



TESIS DOCTORAL

Santiago Cabezas Camarero

DIRECTORES

Eduardo Díaz-Rubio García

Javier Sastre Valera

Virginia de la Orden García

Madrid, 2020

Imágenes de portada y contraportada:

Escudo de la Universidad Complutense de Madrid (versión color y transparente). Tomada de <https://www.ucm.es/buscador/?bci=img&search=ucm>

Fondo de portada y contraportada: fotografía de micropartículas magnéticas empleadas para la captura de CTC con el sistema IsoFlux (Cortesía de la Dra. Virginia de la Orden García).

Fotografías:

Superior: microfotografía de CTC (CK+, centro), células DAPI+ (izquierda), leucocitos (CD45+, derecha)

Inferior: microfotografía de un carcinoma epidermoide de hipofaringe (izquierda; cortesía del Dr. Melchor Sáiz-Pardo Sanz) y de un adenocarcinoma colorrectal de patrón cribiforme (derecha; cortesía de la Dra. Isabel Casado Fariñas).

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES Y DE LA UTILIDAD DE SU CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE CABEZA Y
CUELLO EN ESTADIO AVANZADO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Cabezas Camarero

DIRECTORES

Eduardo Díaz-Rubio García (Director y Tutor)

Javier Sastre Valera (Director)

Virginia de la Orden García (Directora)

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES Y DE LA UTILIDAD DE SU CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE CABEZA Y
CUELLO EN ESTADIO AVANZADO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago Cabezas Camarero

DIRECTORES

Profesor Eduardo Díaz-Rubio García (Director y Tutor)

Profesor Emérito de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

Doctor Javier Sastre Valera (Director)

Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos

Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

Doctora Virginia de la Orden García (Directora)

Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2020

A mis padres

“...confío en que la prudencia de Vuestra Excelencia, poniendo los ojos en mi buen deseo, no desdeñe la cortedad de tan humilde servicio”

Miguel de Cervantes Saavedra

“Al Duque de Béjar” Don Quijote de la Mancha

“Mas lo que suelen olvidar los médicos es que el progreso de su ciencia no depende sólo de la difícil experimentación, sino también de la simple observación del enfermo, cuando se hace no como una rutina, sino con espíritu científico”

Gregorio Marañón

La medicina y nuestro tiempo

AGRADECIMIENTOS

He tenido el privilegio de formarme en una institución, el Hospital Clínico San Carlos, donde grandes especialistas me enseñaron el difícil oficio del Médico y del Oncólogo: siempre que sea factible buscar curar, y cuando no sea posible, intentar alargar la vida con la mayor calidad y menor sufrimiento posibles, y por supuesto, no olvidar nunca *acompañar*. El valioso ejemplo profesional de muchos de ellos sirvió además para estimular la curiosidad por la investigación, felizmente materializada en esta memoria.

Esta Tesis Doctoral es resultado de la exigente formación clínica y larga tradición investigadora que distinguen al servicio de Oncología Médica, dirigido, desde sus inicios y hasta mis primeros años de adjunto, por el Profesor Eduardo Díaz-Rubio. Mi agradecimiento por todo ello y por su labor de Tutor y Director, ya que sin sus ideas, consejos y apoyo, esta Tesis no habría visto la luz. Gracias por fomentar la excelencia en la formación clínica y a la vez apoyar decididamente la investigación así como por las importantes aportaciones al campo de la biopsia líquida y de los biomarcadores a lo largo de los años y de las que tanto he aprendido.

Mi agradecimiento al Dr. Javier Sastre por su labor de co-Director y por sus valiosas enseñanzas, desde residente, en el campo de los tumores digestivos y de la oncología en general. Gracias por contribuir al reclutamiento de pacientes para el estudio, y por las valiosas aportaciones al campo de la investigación en CTC con las que tanto he aprendido.

Gracias a la Dra. Virginia de la Orden García, experta en Células Tumores Circulantes (CTC), por su labor de co-Directora, y por el tiempo y esfuerzo dedicados al análisis de CTC y a enseñarme y formarme en el manejo de esta tecnología. Gracias por el esfuerzo e ilusión que siempre has demostrado por esta línea de investigación y por este proyecto en concreto.

Gracias, en definitiva, a mis tres Directores, ya que esta tesis no habría sido posible sin ninguno de ellos.

Quiero también agradecer al Dr. Pedro Pérez-Segura, actual Jefe de Servicio de Oncología Médica, la confianza depositada en mi desde residente, así como sus enseñanzas en el ámbito de la oncología en general y especialmente del cáncer de cabeza y cuello, la neuro-oncología y el cáncer hereditario, entidades que tengo la suerte

de compartir con él como clínico. De él solo he recibido buenas enseñanzas, consejos inteligentes, y apoyo para poder crecer. Gracias por facilitar que este trabajo llegara a buen puerto y que esta línea de investigación continúe avanzando.

Quiero agradecer y recordar la labor de la Dra. Marisa Maestro en la puesta en marcha de la línea de investigación en CTC iniciada años antes de mi incorporación al servicio así como su aportación al diseño de la primera parte de este proyecto de tesis. Agradezco también la ayuda de la Dra. Silvia Veganzones en la primera parte de este proyecto.

Mi agradecimiento a Beatriz Mediero Valeros, técnico de laboratorio y experta en CTC, por las horas de trabajo y saber hacer y por tu contribución a que esta tesis llegara a su fin.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Vanesa García Barberán, por tener la paciencia de enseñarme los detalles y pasos metodológicos de la NGS y del BEAMing y por su contribución a que partes de esta tesis salieran adelante.

Mi agradecimiento al Dr. Antonio Sánchez Ruiz del H. Puerta de Hierro de Madrid, al Profesor Enrique Aranda del H. Reina Sofía de Córdoba, y a la Dra. Ana López Alfonso del H. Infanta Leonor de Madrid por su importante contribución al reclutamiento de pacientes para el estudio.

También por su importante contribución al reclutamiento de casos quiero dar las gracias al Dr. Miguel Sotelo del H. Infanta Cristina de Parla y que ahora ejerce en el H. María Auxiliadora de Lima, quien además de un excelente oncólogo, es un gran amigo a quien debo parte de mi formación y muchos buenos recuerdos.

Mi agradecimiento a las doctoras Beatriz García Paredes y Asunción Díaz Serrano por su ayuda en el reclutamiento de algunos de los pacientes del estudio, así como a los residentes que también ayudaron en esta labor.

Me gustaría también agradecer a las doctoras María Jesús Fernández Aceñero e Isabel Casado Fariñas, patólogas, su rapidez y buen hacer en la selección de los bloques de

tejido y marcaje de áreas a desparafinar en parte importante de los casos del estudio. Gracias por ayudar a que la biopsia “líquida” aprenda de la “sólida”. Gracias a la Dra. Isabel Casado, al Dr. Melchor Sáiz-Pardo y al Dr. Issa Subhi-Issa, por las magníficas microfotografías que ilustran la portada y algunas figuras de esta memoria.

Quiero agradecer al Dr. Manuel Enrique Fuentes Ferrer de la Unidad de Apoyo a la Investigación del hospital, su importante ayuda y tiempo invertido a la hora de enfrentar el análisis estadístico de esta Tesis Doctoral. Mi agradecimiento también a Francisco Carmona de Academia Arquímedes por la ayuda prestada con algunas partes de este análisis.

Gracias a Isabel Díaz Millán (SuperIsa) que empezó medicina pero prefirió la enfermería, convirtiéndose en una magnífica profesional, atenta y dedicada a los pacientes como pocas personas. Gracias por las decenas de extracciones de sangre “con arrastre” y “sin arrastre”, y por hacer más fácil mi día a día.

Por último, mi hondo agradecimiento a los pacientes que participaron en este estudio y a sus familias, sin cuya generosidad no habría sido posible llevarlo a cabo.

A continuación mi agradecimiento a aquellas personas que, aunque de otra manera, han contribuido de manera igualmente importante a que este trabajo llegara a su fin:

A mis padres, por quererme, y ser un apoyo constante ante cualquier problema u obstáculo, por enseñarme tantas cosas y despertar mi interés y curiosidad por lo nuevo y menos conocido, y por haberme enseñado a cuestionar los prejuicios propios y ajenos. Por inspirar mi deseo, presente desde niño, de hacerme médico. Por demostrarme la enorme gratificación de ayudar al que sufre. Por contagiarme de la inquietud científica que debe acompañar a quien ejerce esta profesión. Por tener siempre palabras cariñosas y de aliento. Esta tesis es para vosotros.

A mi hermano Guille, el pequeño, por demostrarme a diario tu talento, inteligencia, valentía y curiosidad por tantas cosas, y por estar siempre dispuesto a ayudarme. A mis

hermanos José Manuel y Mercedes, los mayores, excelentes personas, por su apoyo y ejemplo en tantas cosas. Gracias a los tres por ser como sois y por haberme acompañado siempre.

A Rebe, por haberme hecho sentir siempre querido y valorado, por apoyarme siempre en los buenos y malos momentos y por aguantar mis defectos con paciencia. Por ser siempre tan alegre y saber contagiarme tu optimismo y por hablarme siempre con cariño y dulzura. Gracias por tu apoyo constante a lo largo de esta, tu segunda tesis en un año.

A mis abuelos, tíos, sobrinos, primos y demás familia, especialmente a los que ya no están, porque habéis sido y sois parte fundamental de mis recuerdos y buenos momentos, y por haber estado siempre cerca a pesar de la distancia.

A mis compañeros del servicio de Oncología Médica en su conjunto, adjuntos, residentes, enfermeras, auxiliares y administrativos y a los de otros servicios del hospital por su compañerismo, ejemplo y enseñanzas a lo largo de estos años.

Gracias a mis amigos, compañeros y profesores de la Universidad de Santiago de Compostela de los que tanto aprendí y tan buenos recuerdos guardo. Gracias a mis compañeros y profesores de la Universidad Claude Bernard Lyon 1, donde tuve mi primer contacto con la Oncología durante 4 meses que siempre recordaré.

ABREVIATURAS

AD: autosómico dominante

ADCA: adenocarcinoma

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNlc: ADN libre circulante

ADNtc: ADN tumoral circulante

ADTI: adenocarcinoma de tipo intestinal

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ALK: anaplastic lymphoma kinase

AR: autosómico recesivo

ARMS: Allelic Refractory Mutation System

ARV7: androgen receptor variant 7 (variante 7 del receptor androgénico)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNtc: ARN tumoral circulante

ASCO: American Society of Clinical Oncology

ASTRO: American Society for Radiation Oncology

AUC: Area Under the Curve (área bajo la curva)

BAC: bloqueo androgénico combinado

BRAF: V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1

BEAMing: beads, emulsion, amplification and magnetics

CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9

CAPEOX: capecitabine-oxaliplatino

CAR: clinical array reader

castPCR: Competitive allele-specific TaqMan PCR

CCC: cáncer de cabeza y cuello

CCC LA: cáncer de cabeza y cuello localmente avanzado

CCC R/M: cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente/metastásica

CDS: carcinoma ductal salivar

CEA: carcinoembryonic antigen (antígeno carcinoembrionario)

CECC: carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

CCR: cáncer colorrectal

CCRm: cáncer colorrectal metastásico
CCRnm: cáncer colorrectal no metastásico
CDS: carcinoma ductal salivar
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
CGE: carcinoma gastro-esofágico
CK: citoqueratinas
CHC: carcinoma hepatocelular
CM: cáncer de mama
CMF: citometría de flujo
CMm: cáncer de mama metastásico
CMS: Consensus Molecular Subtype
CN: cáncer de nasofaringe
CNC: cambios en el número de copias
CNT: células no tumorales
CPHS: cancer de próstata hormone-sensible
CPS: Combined Positive Score
CPRC: cáncer de próstata resistente a la castración
CTC: células tumorales circulantes
CV: cancer de vejiga
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
ddPCR: droplet digital PCR
DEP: dielectroforesis
EAS: efectos adversos
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
ECOG PS: ECOG Performance Status
EEN: extensión extranodal
EGF: epidermal growth factor
EGFR: epidermal growth factor receptor
EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea del Medicamento)
EMT: extirpación mesorrectal total
EpCAM: epitelial cell adhesión molecule
ERK: mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4)

ESMO: European Society of Medical Oncology

EVS: Exome Variant Server

ExAC: Exome Aggregation Consortium

FAM: fracción alélica mutada

FDA: Food and Drug Administration

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FITC: isotiocianato anti-CK-fluoresceína

FMSA: Flexible Micro Spring Array

5FU: 5-fluorouracilo

FOLFIRI: 5FU-Leucovorin-Irinotecán

FOLFOX: 5FU-Leucovorin-Oxaliplatino

FOLFOXIRI: 5FU-Leucovorin-Oxaliplatino-Irinotecán

G1/2: grados 1 y 2

G3/4: grados 3 y 4

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos)

Gy: Gray

HUCSC: Hospital Universitario Clínico San Carlos

HUICP: Hospital Universitario Infanta Cristina de Parla

HUIL: Hospital Universitario Infanta Leonor

HUPH: Hospital Universitario Puerta de Hierro

HURSC: Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba

HDI: human development index (índice de desarrollo humano)

HER-2: v-erb b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)

HIPEC: hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (quimioterapia hipertérmica intraperitoneal)

HR: hazard ratio

HRAS: Harvey murine sarcoma viral oncogene homolog

HRM: High Resolution Melting

HSF: Human Splicing Finder

IA: inmunoafinidad

IC: intervalo de confianza

IGV: Integrative Genomics Viewer

IMRT: intensity-modulated radiation therapy (radioterapia de intensidad modulada)

INE: Instituto Nacional de Estadística

ISLET: Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells

KRAS: kirsten-rat sarcoma viral oncogene homolog

LA: localmente avanzado

LCR: locorregional

LDD: límite de detección

M: enfermedad metastásica

MAF: mutant allele frequency

MASC: mammary-analog secretory carcinoma

Max: máximo

mFOLFOX: FOLFOX modificado

miARN: microARN

Min: mínimo

MLH1: Mutl E. coli Homolog of 1

MMR: mismatch repair

MND: mutación no detectada

mPCR: PCR multiplex

MSH2: MutS E. coli Homolog of 2

MSH6: MutS E. coli Homolog of 6

MSI: microsatellite instability (inestabilidad de microsatellites)

MUT: mutado

n: número

N+: ganglios locorregionales positivos

NAT: nativo

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NGS: next generation sequencing

NRAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

NTRK-1, -2, -3: Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor, type 1, type 2, type 3

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAFC: PhotoAcoustic Flow Cytometry

PARP: poli-ADP ribosa polimerasa

pb: pares de bases

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de polimerasa)

PD1: Programmed Death Receptor 1

PDL1: Programmed Death Receptor 1 ligand

PET: Positron Emission Tomography (Tomografía por Emisión de Positrones)

PF: platino-5FU

PIK3CA: phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, 110-kd, alpha

PMS2: PostMeiotic Segregation Increased S. cerevisiae 2

POLD: Polymerase (dna-directed) Delta 1 catalytic subunit

POLE: Polymerase Dna Epsilon-1

pT: clasificación T anátomo-patológica

PTV: planning-target volumen (volumen diana de planificación)

qPCR: quantitative PCR (PCR cuantitativa)

QT: quimioterapia

QTi: quimioterapia de inducción

QT-naïve: virgen de quimioterapia

QTRT: quimioradioterapia

RA: receptor androgénico

RCP: respuesta completa patológica

REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

RM: resonancia magnética nuclear

R/M: fase recurrente/metastásica

ROS1: v-Ros Avian Ur2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog 1

RT: radioterapia

RT-PCR: PCR en tiempo real

SBRT: sterotactic body radiation therapy (radioterapia esterotáctica corporal)

SERS: Surface-Enhanced Raman Scattering

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de enfermedad
SLP: supervivencia libre de progresión
SLR: supervivencia libre de recaída
SOH: sangre oculta en heces
SRS: stereotactic radiosurgery (radiocirugía estereotáctica)
TC: tomografía computerizada
TDM-1: trastuzumab emtansina
TEM: transición epitelio-mesénquima
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta
TMB: tumor mutational burden (carga mutacional del tumor)
TNM: tumor, node, metastasis
TPEx: docetaxel-platino-cetuximab
TPF: docetaxel-platino-5FU
TRO: tasa de respuestas objetivas
TTCC: Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello
TTD: grupo de Tratamiento de Tumores Digestivos
USA: United States of America
VEB: Virus de Epstein-Barr
VECs: vesículas extracelulares
VGE: vaciamiento ganglionar electivo
VOCs: volatile organic compounds (compuestos orgánicos volátiles)
VPH: Virus del Papiloma Humano
VSC: Variantes Sin Clasificar
WGA: whole genome amplification
WT: wild type (nativo)

ÍNDICES

“Sabemos que en el cerebro se representan los aspectos más estables de la función corporal, en forma de mapas que aportan imágenes a la mente”

Antonio Damasio

Y el cerebro creó al hombre

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

RESUMEN.....	I
SUMMARY	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1. CONCEPTO E INTERÉS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA.....	3
1.2. CÁNCER COLORRECTAL: PERSPECTIVA ACTUAL DE SU EPIDEMIOLOGÍA, PROCESO DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.....	7
1.3. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO: PERSPECTIVA ACTUAL DE SU EPIDEMIOLOGÍA, PROCESO DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.....	27
1.4. BIOPSIA LÍQUIDA: CONCEPTOS, MODALIDADES Y TECNOLOGÍAS EMPLEADAS.....	41
1.4.1. Concepto y modalidades de biopsia líquida	41
1.4.2. Células tumorales circulantes (CTC).....	41
1.4.3. ADN TUMORAL CIRCULANTE (ADNtc).....	55
1.4.4. ARN y MICRO-ARN TUMORAL CIRCULANTE	59
1.4.5. VESÍCULAS EXTRACELULARES	59
1.5. LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL CÁNCER COLORECTAL	60
1.5.1. Células Tumorales Circulantes (CTC).....	60
1.5.2. ADN Tumoral Circulante (ADNtc).....	66
1.6. LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	72
1.6.1. Células Tumorales Circulantes (CTC).....	73
1.6.2. ADN Tumoral Circulante (ADNtc).....	79
2. HIPÓTESIS.....	85
3. OBJETIVOS.....	89
3.1. OBJETIVOS PRINCIPALES	91
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	91
4. PACIENTES Y MÉTODOS	93
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	95
4.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	96

4.3. FINANCIACIÓN	96
4.4. DESCRIPCIÓN DE CADA PARTE DEL ESTUDIO.....	97
4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	100
4.6. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	101
4.7. AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE CTC	104
4.7.1. Aislamiento y enumeración de CTC con CellSearch®	104
4.7.2. Aislamiento, enumeración y recuperación de CTC con IsoFlux™	106
4.7.3. Purificación de las CTC recuperadas con IsoFlux™ mediante el sistema CellCelector™	109
4.8. OBTENCIÓN DE PLASMA DE SANGRE PERIFÉRICA	111
4.9. EXTRACCIÓN DE ADN	112
4.10. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN	116
4.10.1. PCR en tiempo real (RT-PCR): Cobas®, TheraScreen® e Idylla™	116
4.10.2. PCR multiplex.....	118
4.10.3. Competitive Allele-Specific Taqman PCR (castPCR™).....	119
4.10.4. PCR digital.....	119
4.10.5. BEAMing.....	121
4.10.6. Secuenciación masiva (NGS).....	125
4.11. TAMAÑO MUESTRAL.....	130
4.12. ANÁLISIS DE DATOS.....	132
4.12.1. Variables.....	132
4.12.2. Análisis estadístico.....	134
5. RESULTADOS.....	137
5.1. Parte 1: Comparación de la capacidad de detección y recuento de CTC de los sistemas CellSearch e IsoFlux, en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV).	139
5.2. Parte 2: Evaluación de diferentes métodos de análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con el sistema IsoFlux en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV) y correlación con el tumor primario y el plasma.....	177
5.3. Parte 3: Evaluación de la capacidad de detección y recuento de CTC con el sistema IsoFlux y viabilidad de su caracterización molecular en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente o metastásica (R/M).	194

6. DISCUSIÓN	205
6.1. GENERALIDADES	207
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	208
6.3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES	209
6.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS MUTACIONAL EN CTC Y ADNtc	210
6.5. OBJETIVOS PRINCIPALES	212
6.6. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	219
6.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	229
6.8. FORTALEZAS DEL ESTUDIO	231
6.9. PERSPECTIVA FUTURA.....	232
7. CONCLUSIONES	235
8. BIBLIOGRAFÍA	239
9. ANEXOS.....	291

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia por cáncer de colon (A) y recto (B) a nivel mundial por sexo y por tasa estandarizada por edad en el año 2018 según estimación de GLOBOCAN 2018	7
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorectal a nivel mundial en función del sexo en el año 2018 según estimación de GLOBOCAN 2018	7
Figura 3. Incidencia por cáncer de colon y recto en España en función del sexo estimada para el año 2020 según estimación de REDECAN.....	9
Figura 4. Mortalidad por cáncer de colon y recto en España en función del sexo en el año 2018 según datos proporcionados por el INE.	9
Figura 5. Incidencia por cáncer de cabeza y cuello en España en función del sexo estimada para el año 2020 según estimación REDECAN.....	28
Figura 6. Mortalidad por cáncer de cabeza y cuello en España en función del sexo en el año 2018 según datos proporcionados por el INE	28
Figura 7. Tecnologías de enriquecimiento de CTC.....	45
Figura 8. Ejemplo de sistema de microfluído	48
Figura 9. Estructura del estudio y título/descripción de cada una de las 3 partes que lo conforman.....	99
Figura 10. Componentes del sistema CellSearch®	105
Figura 11. Componentes y mecanismo de funcionamiento del sistema IsoFlux™.....	107
Figura 12. Elementos del sistema CellCelector™ empleado para la purificación de la muestra de CTC recuperadas con IsoFlux™.....	111
Figura 13. Portaobjetos con cortes de parafina de una muestra de cáncer de colon.	112
Figura 14. Elementos del IsoFlux™ NGS DNA Kit.....	114
Figura 15. Elementos y pasos para la extracción de ADN libre circulante de plasma .	116
Figura 16. Termociclador Veriti Dx de Applied Biosystems.....	116
Figura 17. Equipo TheraScreen.	117
Figura 18. Sistema Idylla (Biocartis, Bélgica) para el estudio mutacional de RAS en tejido.....	118
Figura 19. Elementos del sistema CLART® CMA multiplex PCR.....	118
Figura 20. Elementos del QuantStudio 3D Digital PCR System	120
Figura 21. Etapas del procesado de la muestra en el QuantStudio 3D Digital PCR System.....	121
Figura 22. Aislamiento y pre-amplificación de ADN y elementos necesarios para llevar a cabo la PCR digital de emulsión	122

Figura 23. Primera parte de la reacción de preamplificación con la disposición de reacciones para cada pocillo de la placa (tabla izquierda) y programa de la PCR multiplex (tabla derecha).....	122
Figura 24. Segunda parte de la reacción de preamplificación.	123
Figura 25. PCR de emulsión e Hibridación.....	123
Figura 26. Mezcla para las reacciones y programa de la PCR de emulsión	124
Figura 27. Detección mediante citometría de las partículas con los fragmentos de ADN mutado y no mutado (nativo) unidos a sondas de fluorescencia.....	124
Figura 28. Esquema de los pasos pre- y post-PCR para la generación de librerías con el Truseq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit (Illumina).....	125
Figura 29. Representación de la fase de extensión-ligamiento para la generación de los amplicones de interés.....	126
Figura 30. Representación de la fase amplificación de los amplicones generados en el paso de extensión-ligamiento.....	127
Figura 31. Representación de la fase de generación de grupos, mostrando la amplificación en puente	127
Figura 32. Representación de la secuenciación paired-end (A), y visualización por fluorescencia de los amplicones amplificados (B)	128
Figura 33. Secuenciador Illumina MiSeq	129
Figura 34. Diagrama de flujo con los pacientes planificados y reclutados para el estudio en los grupos 1 y 2.....	139
Figura 35. Número de órganos afectados por el tumor en el momento de la extracción de las CTC en los pacientes del grupo 1.	142
Figura 36. Distribución del número de líneas de tratamiento recibidas por los pacientes del grupo 1 a fecha del corte de datos (Mayo 2019) (izquierda) y tipo de tratamiento biológico en los pacientes del grupo 1	142
Figura 37. Estatus de los marcadores CEA y CA 19.9 en el momento de la extracción de las CTC en los pacientes del grupo 1	143
Figura 38. Número de CTC detectadas con CellSearch® (A) e IsoFlux™ (B) en pacientes del grupo 1.	143
Figura 39. Número de CTC en función del número de localizaciones metastásicas y de la presencia de metástasis pulmonares o hepáticas en pacientes del grupo 1	146
Figura 40. Estatus de KRAS en función de la lateralidad del tumor primario en el grupo 1.....	147
Figura 41. Número de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario (colon derecho vs colon izquierdo) para la población global y para la población KRAS ^{MUT} y KRAS ^{NAT} en el grupo 1	148
Figura 42. Gráfico de Bland-Altman que muestra el grado de concordancia entre CellSearch® e IsoFlux™ en la detección de CTC en el grupo 1	150

Figura 43. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) (izquierda) y SG censurada a los 24 meses de supervivencia estimada en cada grupo desde la extracción de CTC. Curva de supervivencia libre de progresión (SLP) en el grupo 1.....	151
Figura 44. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función la localización del tumor primario (colon izquierdo vs colon derecho) en los pacientes del grupo 1	154
Figura 45. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del número de órganos afectos (1 vs > 1), en los pacientes del grupo 1	155
Figura 46. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del valor del marcador CEA (< 5 vs \geq 5), en los pacientes del grupo 1.....	155
Figura 47. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del valor del marcador CA 19.9 (< 35 vs \geq 35), en los pacientes del grupo 1.	155
Figura 48. Porcentaje de CTC enumeradas con CellSearch® en función del punto de corte (< 3 vs \geq 3) en los pacientes del grupo 1	156
Figura 49. Porcentaje de CTC enumeradas con IsoFlux™ en función del punto de corte (< 11 vs \geq 11) en los pacientes del grupo 1	156
Figura 50. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección en el grupo 1	157
Figura 51. Curvas de Kaplan-Meier en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección en el grupo 1 y censuradas a los 24 meses de supervivencia estimada	159
Figura 52. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1.	162
Figura 53. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1	162
Figura 54. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y del valor de CEA (< 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1.....	163
Figura 55. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y del valor de CEA (\leq 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1.....	163
Figura 56. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y del valor de CA 19.9 (\leq 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1.....	164
Figura 57. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y del valor de CA 19.9 (\leq 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1.....	164
Figura 58. Curvas de supervivencia libre de progresión en el grupo 1 para la población global (A) y en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección (B y C).....	165

Figura 59. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1	168
Figura 60. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1	168
Figura 61. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y del valor de CEA (< 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1....	169
Figura 62. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y del valor de CEA (< 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1	169
Figura 63. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs \geq 3) y del valor de CA 19.9 (< 35 vs >35) en los pacientes del grupo 1	170
Figura 64. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs \geq 11) y del valor de CA 19.9 (\leq 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1	170
Figura 65. Número de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario y del punto de corte para cada sistema de recuento en el grupo 1 ..	174
Figura 66. Número de pacientes con CTC por encima y por debajo de la mediana con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario en el grupo 1	176
Figura 67. Tipo de mutación en KRAS detectada por castPCR™ en el Tumor y en las CTC en los pacientes de los grupos 1 y 2	179
Figura 68. Perfil mutacional de KRAS en tumor primario, recidiva local vs 2º primario, metástasis hepática y CTC.	184
Figura 69. Perfil mutacional de KRAS en tumor primario y en CTC	184
Figura 70. Perfil mutacional de KRAS por castPCR en tumor primario, metástasis pulmonares y en CTC	185
Figura 71. Perfil mutacional de KRAS por castPCR en tumor primario y en CTC.....	185
Figura 72. Gráficos de los resultados del análisis por BEAMing en líneas celulares y en CTC obtenidas con IsoFlux y purificadas con CellSelector en estudios de “spike-in”..	188
Figura 73. Diagrama de flujo con los pacientes planificados para su inclusión en el grupo 3, y los incluidos hasta la fecha	189
Figura 74. Perfil mutacional de KRAS por PCRm en tumor primario y mediante BEAMing en ADN libre circulante y ADN de CTC recuperadas por IsoFlux y purificadas con CellSelector.....	193
Figura 75. Diagrama de flujo con los pacientes y determinaciones de CTC planificados para su inclusión en el grupo 4, y los incluidos hasta la fecha	194

Figura 76. Respuesta parcial duradera al bloqueo androgénico combinado en un carcinoma de ducto salivar (CDS) con rápida disminución de los valores de ADN mutado en PIK3CA E545K tanto en ADN libre circulante como en ADN de CTC.....	197
Figura 77. Progresión al bloqueo androgénico combinado en un Carcinoma de Ducto Salivar con mutación en PIK3CA E542K	199
Figura 78. Anatomía patológica del ADTI	200
Figura 79. Resumen de la historia oncológica del paciente con ADTI de origen nasoetomoidal y estudios moleculares realizados en las muestras del tumor primario y en ADN de CTC	201
Figura 80. Resumen de la historia oncológica del paciente con ADTI de origen nasoetomoidal y estudio mutacional de RAS mediante BEAMing en las muestras del tumor primario y mutación encontrada por castPCR en ADN de CTC.....	201
Figura 81. Detección y recuperación de CTC con IsoFlux y estudio molecular en ADN de CTC y ADN libre circulante en plasma mediante panel de secuenciación masiva (CC-HCSC9)	204
Figura 82. Detección y recuperación de CTC con IsoFlux y estudio molecular en ADN de CTC mediante panel de secuenciación masiva (CC-HCSC14).....	204

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones moleculares más frecuentes en el cáncer colorrectal (CCR) y tratamientos dirigidos.	12
Tabla 2. Grupos de la clasificación del Consensus Molecular Subtypes (CMS) para el Cáncer Colorectal (CCR).	12
Tabla 3. Diferencias observadas en supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los estudios de referencia en función de la lateralidad del tumor primario.	21
Tabla 4. Alteraciones moleculares más frecuentes en el cáncer de cabeza y cuello (CCC) y tratamientos biológicos con actividad demostrada.	32
Tabla 5. Estudios más relevantes empleando el sistema CellSearch® en el aislamiento de CTC.	47
Tabla 6. Estudios más relevantes empleando el sistema IsoFlux™ en el aislamiento de CTC.	50
Tabla 7. Sensibilidad estimada de las diferentes tecnologías de análisis mutacional empleadas para biopsia líquida.	59
Tabla 8. Estudios más relevantes en pacientes con CCR que han llevado a cabo estudios moleculares en CTC.	65
Tabla 9. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CCR.	71
Tabla 10. Estudios más relevantes con CTC en pacientes con CECC VPH-no relacionado.	76
Tabla 11. Estudios más relevantes con CTC en pacientes con CN VEB+.	78
Tabla 12. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CECC VPH-no relacionado.	80
Tabla 13. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CECC VPH+.	81
Tabla 14. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CN VEB+.	83
Tabla 15. Hospitales participantes en el estudio.	95
Tabla 16. Características y análisis realizados en cada grupo de pacientes y correspondencia con cada una de las partes del estudio (para esto último véase código de colores).	99
Tabla 17. Resumen del programa empleado en el termociclador ProFlex 2x Flat PCR System para la PCR digital (Elaboración propia a partir de ficha técnica de QuantStudio 3D Digital PCR System).	120
Tabla 18. Resumen de las características de los pacientes.	141
Tabla 19. Recuento de CTC mediante CellSearch e IsoFlux para cada paciente del grupo 1.	144

Tabla 20. Recuento de CTC mediante CellSearch e IsoFlux para cada paciente del grupo 2.	145
Tabla 21. Asociación entre el estatus de KRAS y la lateralidad del tumor primario en el grupo 1.	147
Tabla 22. Asociación de diferentes características clínicas con el recuento de CTC mediante CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1.	149
Tabla 23. Asociación de diferentes características clínicas con el recuento de CTC mediante CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1. Correlación entre CellSearch® e IsoFlux™ en el recuento de CTC para diferentes variables clínicas.	150
Tabla 24. Supervivencia global en función de diferentes variables clínicas en los pacientes del grupo 1.	152
Tabla 25. Supervivencia libre de progresión en función de diferentes variables clínicas en los pacientes del grupo 1.	153
Tabla 26. Capacidad discriminativa para la supervivencia medida por el estadístico C, de cada sistema de recuento de CTC, según el punto de corte, de los marcadores tumorales CEA y CA 19.9 y de las CTC y estos marcadores combinados.	160
Tabla 27. Supervivencia global en función de diferentes variables clínicas y del punto de corte de CTC con cada sistema de recuento en los pacientes del grupo 1.	161
Tabla 28. Supervivencia libre de progresión en función de diferentes variables clínicas y del punto de corte de CTC con cada sistema de recuento en los pacientes del grupo 1.	167
Tabla 29. Resumen de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global en el grupo 1, tanto en la población global como en función del punto de corte de CTC. ..	171
Tabla 30. Análisis univariante y multivariante de la supervivencia global en el grupo 1.	172
Tabla 31. Análisis univariante y multivariante de la supervivencia libre de progresión en el grupo 1.	173
Tabla 32. Asociación de diferentes características clínicas con el número de CTC según el punto de corte seleccionado para CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1.	175
Tabla 33. Asociación entre la mediana del recuento de CTC con CellSearch e IsoFlux en función de la lateralidad del tumor primario.	176
Tabla 34. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 1.	180
Tabla 35. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 2.	182
Tabla 36. Concordancia del estatus de KRAS y tipo de mutación entre el tumor primario y las CTC con cada método de análisis en el grupo 1 y en el grupo 2.	183
Tabla 37. Estudios de KRAS mediante BEAMing empleando líneas celulares.	187
Tabla 38. Resumen de las características de los pacientes.	190

Tabla 39. Recuento de CTC y estatus de RAS en tumor primario, plasma y CTC.	192
Tabla 40. Concordancia del estatus de RAS y del tipo de mutación entre el tumor primario, el plasma y las CTC en los pacientes del grupo 3.....	193
Tabla 41. Resumen de las características de los pacientes en la población global.....	195
Tabla 42. Número de determinaciones y recuento de CTC en la población global y en función del tipo histológico y del anticuerpo empleado en la detección.	196
Tabla 43. Recuento de CTC y estudios moleculares realizados en CTC y en plasma en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello de histología no epidermoide.....	202
Tabla 44. Recuento de CTC con IsoFlux™ en 9 pacientes con cáncer de cabeza y cuello y resultados de los estudios moleculares empleando secuenciación masiva (NGS).....	203
Tabla 45. Diferencias observadas en diferentes características clínicas entre mujeres y hombres en el grupo 1.....	214
Tabla 46. Estudios sobre la concordancia del análisis mutacional de RAS y otros genes entre el tumor y las CTC.....	221
Tabla 47. Estudios con ADNtc y con CTC que describen la aparición de clonalidad RAS mutada en pacientes con CCR RAS nativo.	224

RESUMEN

“Lo que hace grande la historia de Roma no es que haya sido hecha por hombres diferentes a nosotros, sino que haya sido hecha por hombres como nosotros”

Indro Montanelli. Historia de Roma.

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma colorrectal (CCR) y el cáncer de cabeza y cuello (CCC) son dos cánceres prevalentes y con tasas de supervivencia notablemente mejorables. Las células tumorales circulantes (CTC) constituyen una modalidad de biopsia líquida cuya utilidad como reservorio de información molecular ha sido insuficientemente estudiada. CellSearch®, un método de inmunoafinidad que emplea anticuerpos anti-EpCAM, es el sistema de detección de CTC más utilizado hasta la fecha y el único aprobado por la FDA para su uso asistencial, pero sólo permite la enumeración y no la recuperación de CTC para su caracterización molecular. IsoFlux™ es un sistema de enriquecimiento de CTC por inmunoafinidad que emplea también anticuerpos anti-EpCAM, y que además de la enumeración de CTC permite su recuperación para realizar análisis moleculares. IsoFlux™ solo ha sido evaluado previamente en una pequeña y heterogénea serie de pacientes con CCR y nunca se ha testado en pacientes con CCC.

El objetivo principal de este estudio fue comparar la capacidad en la enumeración de CTC de CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes con CCR metastásico (CCRM). Los objetivos secundarios fueron la evaluación de diferentes métodos de análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™ en CCRM y la enumeración y recuperación de CTC por IsoFlux™ y su análisis mutacional en pacientes con CCC en fase recurrente/metastásica (R/M).

PACIENTES Y MÉTODOS

Este fue un proyecto prospectivo y multicéntrico, realizado en 5 hospitales españoles, constituido por 4 grupos de pacientes y 3 partes diferenciadas con un nexo común: la detección, enumeración y recuperación de CTC con el sistema IsoFlux™.

- **Parte 1 (Grupo 1:** pacientes con CCRM, quimio-naïve (QT-naïve) para la enfermedad avanzada): se comparó la capacidad de detección y recuento de CTC de los sistemas CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes con CCRM.
- **Parte 2 (Grupo 1, grupo 2** (pacientes con CCRM KRAS nativo (KRAS^{NAT}) en progresión a QT para la enfermedad avanzada) **y grupo 3** (pacientes con CCRM, QT-naïve para la enfermedad avanzada): se evaluaron diferentes métodos de análisis mutacional

en el tumor, en ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™, y en ADN libre circulante (ADNlc) en plasma, en pacientes con CCRm.

- **Grupos 1 y 2:** análisis mutacional de KRAS en el tumor (RT-PCR (Cobas4800, TheraScreen) y castPCR™), y en ADN de CTC (RT-PCR (Cobas4800, TheraScreen), PCR multiplex (CLART mPCR) y castPCR™).
- **Grupos 3:** análisis mutacional de KRAS y NRAS en el tumor (RT-PCR (TheraScreen, Idylla), en CTC (BEAMing) y en ADNlc (BEAMing).
- **Parte 3 (Grupo 4** (pacientes con CCC en fase R/M de histología epidermoide (CE) o no (CNE)): se evaluó la capacidad de detección y recuento de CTC con el sistema IsoFlux™. Análisis mutacional en ADN de CTC y en ADNlc con métodos distintos según el tipo histológico (PCR digital y Secuenciación masiva (NGS)).

RESULTADOS

En el grupo 1 (n=34) la mediana de CTC con CellSearch® fue 1 (Min-max: 0-78) y con IsoFlux™ fue 8 (Min-max: 0-419), mostrando ambos sistemas baja correlación ($\rho=0.411$, $p=0.016$) y pobre concordancia en diagrama de Bland-Altman.

CTC ≥ 3 con CellSearch® (HR 1.82, IC 95% 0.78-4.23) y CTC ≥ 11 con IsoFlux™ (HR 1.34, IC 95% 0.62-2.90) fueron los mejores puntos de corte para predecir la supervivencia en el grupo 1. Aunque no alcanzó la significación estadística, la supervivencia global (SG) fue mayor con CellSearch® <3CTC (CTC<3 vs ≥ 3 : 25.5 vs 21.9 meses, $p=0.158$) y con IsoFlux™<11CTC (CTC<11 vs ≥ 11 : 26.5 vs 21.9 meses, $p=0.459$).

En el análisis multivariante, el sexo ($p=0.005$) y el CA 19.9>35 ($p=0.016$) fueron los únicos factores pronósticos independientes para la SG. CellSearch CTC ≥ 3 estuvo próximo a la significación estadística ($p=0.063$) para la SG. CellSearch CTC ≥ 3 ($p=0.005$) e IsoFlux CTC ≥ 11 ($p=0.002$), el sexo (0.002), el número de líneas de tratamiento y el CA 19.9>35, fueron factores pronósticos independientes para la supervivencia libre de progresión (SLP).

En el grupo 1, al comparar con el estatus de KRAS por RT-PCR en el tumor, la sensibilidad del análisis mutacional de KRAS en CTC fue: cobas® RT-PCR 0% (0/17), CLART® CMA mPCR 12.5% (1/8: 1 MUT, 0 NAT), castPCR™ 67% (10/15: 6 MUT, 4 NAT).

En el grupo 2 (n=22), por definición todos KRAS^{NAT} por RT-PCR en tumor, la concordancia del estatus de KRAS en CTC fue: RT-PCR 100% (15/15 NAT), castPCRTM 70% (7/10: 4 NAT, 3 MUT).

Empleando castPCRTM en tumor y CTC la concordancia **en el grupo 1** fue del 70% (7/10: 6 MUT, 1 NAT), y **en el grupo 2** del 67% (6/9: 4 NAT, 2 MUT).

En el grupo 3 (n=29) la mediana de CTC fue 3 (rango Min-max: 0-15). Al comparar con el estatus de RAS por mPCR (Idylla®) o RT-PCR (TheraScreen®) en tumor, la sensibilidad del análisis mutacional de RAS por BEAMing en ADNlc fue del 91% (21/23: 11 NAT, 10 MUT) y en CTC del 58% (7/12: 5 NAT, 2 MUT). La concordancia del estatus de RAS por BEAMing en ADNlc y en CTC fue del 64% (7/11: 5 NAT, 2 MUT).

En el grupo 4 (n=14), la mediana de CTC detectadas en 25 determinaciones de CTC fue 4 (rango min-max: 0-49). En 3/5 pacientes con CNE se detectaron mutaciones en ADN de CTC en PIK3CA (n=2) y en KRAS (n=1). En 7/9 pacientes con CE, se detectaron, mediante NGS en ADN de CTC, 360 variantes en 15 de los genes más frecuentemente mutados en CCC, siendo baja la concordancia con el ADNlc.

CONCLUSIONES

- IsoFluxTM es más eficiente que la tecnología estándar, CellSearch®, en la detección de CTC en pacientes con CCRm y permite su caracterización molecular por diferentes tecnologías para el análisis de mutaciones.
- CellSearch® CTC \geq 3 e IsoFluxTM CTC \geq 11 fueron los mejores puntos de corte con valor pronóstico en CCRm en esta serie.
- IsoFluxTM permite la detección de CTC en pacientes con CCC de histología epidermoide y no epidermoide, así como la realización de análisis mutacionales por diferentes métodos.
- Las CTC recuperadas con IsoFluxTM en pacientes con CCRm y en CCC aportan información molecular que puede ser discordante de la aportada por la biopsia tumoral y por el ADNlc en el plasma.
- Estos resultados deben ser validados en un estudio con una muestra mayor.

SUMMARY

*“What makes the history of Rome great is not that it was made by men other than us,
but that it was made by men like us”*

Indro Montanelli. History of Rome.

BACKGROUND

Colorectal adenocarcinoma (CRC) and head and neck carcinoma (HNC) are prevalent cancers with poor survival rates. Circulating tumor cells (CTC) constitute a liquid biopsy modality that has been insufficiently studied as a reservoir of molecular information. CellSearch®, an immunoaffinity-based method that uses anti-EpCAM antibodies, is the most widely used CTC detection system to date and the only one approved by the FDA for healthcare use. However, CellSearch® only allows enumeration and not the recovery of CTC for molecular characterization. IsoFlux™ is an immunoaffinity-based CTC enrichment method that also uses anti-EpCAM antibodies. In addition to enumeration, IsoFlux™ permits CTC recovery for molecular analysis, but has only been previously evaluated in a small and heterogeneous series of patients with CRC and has never been tested in patients with HNC.

The primary endpoint of this study was to compare the ability to enumerate CTC with CellSearch® and IsoFlux™ in patients with metastatic CRC (mCRC). Secondary endpoints were the evaluation of different methods of mutational analysis in CTC recovered with IsoFlux™ in mCRC and the enumeration and recovery of CTC with IsoFlux™ and their mutational analysis in patients with recurrent/metastatic (R/M) HNC.

PATIENTS AND METHODS

This was a prospective and multicenter study, carried out in 5 Spanish hospitals, consisting of 4 groups of patients and 3 different parts with a common link: the detection, enumeration and recovery of CTC with the IsoFlux™ system.

- **Part 1** (Group 1: patients with mCRC, chemo-naïve (CT-naïve) for advanced disease): Comparison of CTC detection and enumeration with the CellSearch® and IsoFlux™ in patients with mCRC.
- **Part 2 (Group 1, group 2** (patients with wild-type KRAS mCRC (KRAS^{WT}) progressing to CT for advanced disease) and **group 3** (patients with mCRC, CT-naïve for advanced disease): different methods for KRAS mutational analysis were evaluated in tumor, in CTC recovered with IsoFlux™, and in circulating cell-free DNA (cfDNA) in plasma, in patients with mCRC.

- **Groups 1 and 2:** KRAS mutational analysis in tumor (RT-PCR (Cobas4800, TheraScreen) and castPCR™), and in CTC DNA (RT-PCR (Cobas4800, TheraScreen), multiplex PCR (CLART mPCR) and castPCR™).
- **Groups 3:** KRAS and NRAS mutational analysis in tumor (RT-PCR (TheraScreen, Idylla), in CTC (BEAMing) and in cfDNA (BEAMing).
- **Part 3 (Group 4** (patients with R/M HNC of squamous (SHNC) or non-squamous (NSHNC) histology): CTC detection and enumeration with IsoFlux™ system was evaluated. Mutational analyses in CTC DNA and in cfDNA with different methods depending on histology (digital PCR in NSHNC and Next Generation Sequencing (NGS) in SHNC) were performed.

RESULTS

In group 1 (n = 34) median CTC with CellSearch® was 1 (Min-max: 0-78) and with IsoFlux™ it was 8 (Min-max: 0-419). Both systems showed a low correlation ($\rho = 0.411$, $p = 0.016$) with a poor concordance in the Bland-Altman plot.

CTC ≥ 3 with CellSearch® (HR 1.82, 95% CI 0.78-4.23) and CTC ≥ 11 with IsoFlux™ (HR 1.34, 95% CI 0.62-2.90) were the best cut-off points to predict survival in group 1. Although it did not reach statistical significance, overall survival (OS) was greater with CellSearch® <3CTC (CTC <3 vs ≥ 3 : 25.5 vs 21.9 months, $p = 0.158$) and with IsoFlux™ <11CTC (CTC <11 vs ≥ 11 : 26.5 vs 21.9 months, $p = 0.459$).

In the multivariate analysis, sex ($p = 0.005$) and CA 19.9 > 35 ($p = 0.016$) were the only independent prognostic factors for OS. CellSearch CTC ≥ 3 was close to statistical significance ($p = 0.063$) for OS. CellSearch CTC ≥ 3 ($p = 0.005$) and IsoFlux CTC ≥ 11 ($p = 0.002$), sex (0.002), number of treatment lines, and CA 19.9 > 35 were independent prognostic factors for progression-free survival (PFS).

In group 1, when compared to the status of KRAS by RT-PCR in the tumor, the sensitivity of the mutational analysis of KRAS in CTC was: cobas® RT-PCR 0% (0/17), CLART® CMA mPCR 12.5% (1/8: 1 MUT, 0 NAT), castPCR™ 67% (10/15: 6 MUT, 4 NAT).

In group 2 (n = 22), by definition all KRAS^{WT} by RT-PCR in tissue, the concordance of KRAS status in CTC was: RT-PCR 100% (15/15 KRAS^{WT}), castPCR™ 70% (7 / 10: 4 KRAS^{WT}, 3 KRAS^{MUT}).

Using castPCR™ both in tissue and CTC, the agreement in **group 1** was 70% (7/10: 6 KRAS^{MUT}, 1 KRAS^{WT}), and in **group 2** it was 67% (6/9: 4 KRAS^{WT}, 2 KRAS^{MUT}).

In **group 3** (n = 29) median CTC was 3 (Min-max range: 0-15). When compared to the status of RAS by mPCR (Idylla®) or RT-PCR (TheraScreen®) in tumor, the sensitivity of the RAS mutational analysis with BEAMing in cfDNA was 91% (21/23: 11 RAS^{WT}, 10 RAS^{MUT}) and 58% in CTC (7/12: 5 RAS^{WT}, 2 RAS^{MUT}). The concordance of the RAS status by BEAMing in cfDNA and in CTC was 64% (7/11: 5 RAS^{WT}, 2 RAS^{MUT}).

In **group 4** (n = 14), median CTC detected in 25 CTC determinations was 4 (min-max range: 0-49). CTC DNA mutations were detected in 3/5 patients with NSHNC: PIK3CA (n = 2), KRAS (n = 1). In 7/9 patients with SHNC, 360 variants were detected by means of NGS in CTC DNA, in 15 of the genes most frequently mutated in SHNC, showing low concordance with cfDNA.

CONCLUSIONS

- IsoFlux™ detects CTC in a majority of patients and is more efficient than the standard technology, CellSearch®, in detecting CTC in patients with mCRC.
- CellSearch® CTC ≥ 3 and IsoFlux™ CTC ≥ 11 were the best cut-off points with prognostic value in mCRC in this series.
- IsoFlux™ allows for molecular characterization in CTC from patients with mCRC using different techniques for mutational analysis.
- IsoFlux™ detects CTC in a majority of patients with HNC of squamous and non-squamous histology, and allows for CTC mutational analysis using different techniques.
- CTC recovered with IsoFlux™ in patients with mCRC and in HNC provide molecular information that may be discordant from that provided by the tumor biopsy and by cfDNA in plasma.
- These results should be validated in a study with a larger sample.

1. INTRODUCCIÓN

“...seguía siendo una disciplina joven. Entendida como conjunto de teorías, jerga y prácticas que, en la medida en que se enseñan, pasan a tener discípulos”

María M. Portuondo

Ciencia secreta. La cosmografía española y el Nuevo Mundo

“Antes de exponer nuestra personal contribución al tema de estudio, es costumbre trazar la historia de la cuestión, ya para señalar nuestro punto de partida, ya para rendir plena justicia a los sabios insignes que nos precedieron y nos abrieron el camino de la investigación”

Santiago Ramón y Cajal.

Los tónicos de la voluntad: Reglas y consejos sobre investigación científica.

1. 1. CONCEPTO E INTERÉS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

El cáncer es la 2ª causa de muerte no traumática en todo el mundo después de las enfermedades cardiovasculares, y se prevé que en las próximas dos décadas termine ocupando el 1^{er} lugar (1). Según el proyecto GLOBOCAN, en el año 2018 hubo 18,1 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo, y la estimación es que en el año 2040 esta cifra aumente un 63%, hasta los 29,5 millones de nuevos casos de cáncer (2).

En los países con un alto nivel socioeconómico, el cáncer es ya la 1ª causa de mortalidad y posiblemente esa tendencia se generalice a otros países, a la luz del importante aumento de incidencia previsto para las próximas dos décadas (3). Las razones para este aumento de incidencia radican en el envejecimiento de la población y en la incorporación de varios países no occidentales y en vías de desarrollo a hábitos de vida occidental.

Históricamente, el tratamiento del cáncer se ha visto condicionado por unos pobres resultados de supervivencia, sumados a importantes efectos adversos tanto agudos como a largo plazo. Desde siempre, el médico, consciente de sus limitaciones, ha buscado aproximarse al ideal de la curación -si es que esto es realmente posible- minimizando la iatrogenia. Este ideal sigue revelándose aún lejano y, contrasta con el alto nivel de tecnificación y precisión alcanzados por otras disciplinas que emergen de las ciencias exactas, como es el caso de las ingenierías o de la informática. Los avances científicos y tecnológicos que estas vienen deparándonos en las últimas décadas y especialmente en los últimos años, constituyen un importante estímulo para afrontar el enorme reto de convertir a la Medicina en una ciencia de precisión. Durante el siglo XX, la cirugía y otras especialidades médicas como la neurología, la endocrinología y la infectología, fueron las disciplinas que más se aproximaron al concepto de una medicina personalizada, bien fuera por sus avances terapéuticos y/o diagnósticos. A partir de los años 80 del siglo pasado, la vanguardia de este cambio en la manera de concebir la medicina, basada cada vez más en un racional biotecnológico, pasó a ser ocupada por la medicina cardiovascular gracias, fundamentalmente, a los avances en las técnicas de hemodinámica y a los tratamientos de prevención primaria y secundaria para la cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca (4). Sin embargo, en los últimos 15 años, tras el gran hito científico que supuso secuenciar el genoma humano, el cual permitió acelerar el conocimiento de la biología molecular del cáncer, la Oncología ha pasado a

liderar la carrera de la Medicina de Precisión, al haber conseguido transformar, en apenas dos décadas, el tradicional abordaje puramente clínico del cáncer, en un complejo pero eficaz proceso diagnóstico y terapéutico basado en un sólido racional clínico pero también biomolecular. El concepto de “Medicina de Precisión” no sólo hace referencia al papel fundamental de los medicamentos sino también, e inseparables de estos últimos, a los métodos de diagnóstico. Dentro de estos últimos, las técnicas de imagen, cada vez más sofisticadas, pero también, la patología molecular, y un derivado de esta última conocido como *biopsia líquida*, están permitiendo ofrecer a los profesionales y a los pacientes, diagnósticos cada vez más precisos y a la vez incrementar las opciones terapéuticas (5)(6).

En opinión de este autor la “biopsia líquida” podría definirse como *“la obtención de una muestra de un fluido biológico que tras un análisis cuantitativo y/o caracterización molecular aporta información con fines diagnósticos, pronósticos o predictivos de respuesta a un tratamiento”*. El término “biopsia líquida” hace obligatoriamente referencia a una muestra “líquida”. Sin embargo en la definición empleo el término “fluido” de forma interesada ya que, existen desde hace tiempo ejemplos de test diagnósticos en gases exhalados, como por ejemplo el “test del aliento” para la detección del *Helicobacter Pylori* a través de la ingesta de una solución con urea marcada con carbono 13 (^{13}C) ó 14 (^{14}C) y el posterior exhalado de CO_2 marcado por el efecto de la ureasa de esta bacteria. En el ámbito oncológico, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) constituyen un área de investigación muy activa que, por ejemplo, ya ha demostrado utilidad en la predicción de la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con cáncer de pulmón (7).

Este trabajo de tesis se centra en la utilidad de las células tumorales circulantes (CTC), en dos cánceres frecuentes pero muy diferentes entre sí: el cáncer colorrectal (CCR) y el cáncer de cabeza y cuello (CCC). El CCR, caracterizado por tener una histología de tipo adenocarcinoma, constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad por cáncer en España y en el Mundo. Ha habido importantes avances en la detección precoz y en su tratamiento en los últimos 15 años, gracias a la generalización de la colonoscopia como herramienta preventiva y de diagnóstico precoz, y a la irrupción de complejas técnicas quirúrgicas, de radioterapia (RT) y de nuevos tratamientos sistémicos dirigidos a dianas moleculares. Por el contrario, el CCC, aunque menos frecuente que el CCR,

ocupa el 6º lugar en incidencia y el 8º en mortalidad en España y en el mundo, y aunque deriva, al igual que el CCR, de un tejido epitelial, se caracteriza, en más del 90% de los casos, por poseer una histología muy diferente, de tipo epidermoide. Su biología es compleja y carente de alteraciones moleculares frecuentes y accionables frente a las que diseñar terapias antidiana. Es, además, uno de los cánceres que, además de sus elevada mortalidad, producen una mayor disrupción en la calidad de vida y en funcionamiento social del ser humano.

Tanto por su elevada prevalencia como por la necesidad de mejorar las elevadas cifras de morbi-mortalidad del CCR y del CCC, es obligado continuar investigando en mejores terapias y métodos de prevención y mejores métodos diagnósticos en estas dos entidades.

1.2. CÁNCER COLORRECTAL: PERSPECTIVA ACTUAL DE SU EPIDEMIOLOGÍA, PROCESO DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

1.2.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

A nivel mundial el CCR ocupó el 3^{er} lugar en incidencia y el 2^o en mortalidad en el año 2018. Al atender a su distribución por sexos, en los varones el CCR ocupó el 3^{er} lugar en incidencia y el 4^o en mortalidad, siendo el 2^o en incidencia y el 3^o en mortalidad en las mujeres (Figuras 1 y 2).

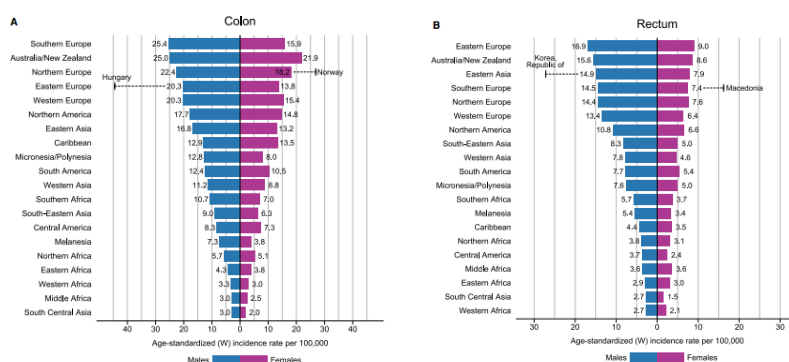


Figura 1. Incidencia por cáncer de colon (A) y recto (B) a nivel mundial por sexo y por tasa estandarizada por edad en el año 2018 según estimación de GLOBOCAN 2018 (Modificado de Bray, et al. CA Cancer J Clin 2018;68:394–424).

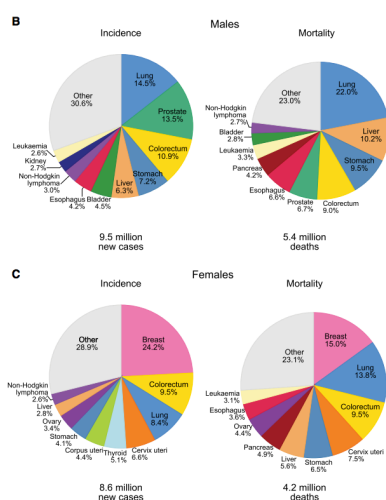


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorectal a nivel mundial en función del sexo en el año 2018 según estimación de GLOBOCAN 2018 (Modificado de Bray, et al. CA Cancer J Clin 2018;68:394–424).

En los países con un alto o muy alto nivel de desarrollo humano (traducción del inglés de “Human Development Index” ó HDI, y representados en su mayoría por países de cultura o influencia occidental siendo excluidos de esta definición la mayor parte del África subsahariana, gran parte de oriente medio, el subcontinente indio y gran parte de los países del sudeste asiático por tener un HDI medio o bajo), el CCR fue el 3^o en

incidencia y el 5º en mortalidad en varones y el 3º en incidencia y mortalidad en mujeres. En el informe de GLOBOCAN de 2018 se propone al CCR como un marcador del desarrollo socioeconómico siendo poco frecuente en países en vías de desarrollo, mientras que su incidencia aumenta conforme lo hace el HDI del país. Este incremento en la incidencia parece ligado a factores dietéticos, a la obesidad, y al estilo de vida, mientras que la disminución en la mortalidad observada en varios países occidentales se atribuye a la implementación de programas de detección precoz y a la mejora en el manejo y tratamiento del CCR (8).

En EEUU, la estimación para el año 2019, es que se produjeron 145.000 nuevos casos y 51000 muertes por CCR, ocupando el 3º lugar en incidencia y mortalidad tanto en hombres como en mujeres. Desde la década de 1990 se viene observando un rápido descenso en la incidencia de casos de CCR, atribuida por igual a modificaciones en el estilo de vida y a los programas de cribado poblacional, especialmente por el empleo de la colonoscopia que se vio incrementado de un 21% a un 60% entre los años 2000 y 2015. No obstante, este descenso en la incidencia enmascara el incremento de aproximadamente un 2% por año desde 1995 en los menores de 55 años, y cuyas causas no están claras. En un estudio realizado en 1.922.167 pacientes, se observó que la incidencia de CCR entre 1988 y 2007 en varios países de los 5 continentes se incrementó solamente en aquellos pacientes diagnosticados con < 50 años, y además lo hizo a expensas del incremento del cáncer de recto (9). De hecho, se estima que la incidencia de los cánceres de colon y recto en personas de entre 20 y 34 años habrá aumentado un 90% y un 124%, respectivamente, en el año 2030 (10)(11). En España, según la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), se estima que en el año 2020 se diagnosticarán 44.231 nuevos casos de cáncer colorectal (CCR) ocupando así el 1º lugar en incidencia. Según datos del registro *INEbase* del Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2018 el CCR, con 15288 fallecimientos, ocupó el 2º lugar en mortalidad tras el cáncer de pulmón. Se estima que la incidencia del CCR, en 2020, ocupe también el 2º lugar tanto en hombres como en mujeres tras el cáncer de próstata y el cáncer de mama, respectivamente. En cuanto a la mortalidad por sexos, en el año 2018, el CCR ocupó el 2º lugar en mortalidad en varones, tras el cáncer de pulmón, y también en mujeres tras el cáncer de mama (**Figuras 3 y 4**) (2).

TIPO TUMORAL	N	TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	6.049	Cavidad Oral y Faringe	2.555
Esófago	1.908	Esófago	475
Estómago	4.703	Estómago	2.874
Colon y recto	26.044	Colon y recto	18.187
Colon	17.433	Colon	12.635
Recto	8.611	Recto	5.552
Hígado	4.971	Hígado	1.624
Vesícula biliar	1.521	Vesícula biliar	1.454
Páncreas	4.384	Páncreas	3.954
Laringe	2.825	Laringe	386
Pulmón	21.847	Pulmón	7.791
Melanoma de piel	2.507	Melanoma de piel	3.672
Próstata	35.126	Mama	32.953
Testículo	1.310	Cérvix Uterino	1.972
Riñón (sin pelvis)	5.109	Cuerpo Uterino	6.804
Vejiga urinaria	18.071	Óvulo	3.645
Encéfalo y sistema nervioso	2.263	Riñón (con pelvis)	2.191
Tiroides	1.124	Vejiga urinaria	4.279
Linfoma de Hodgkin	854	Encéfalo y sistema nervioso	2.152
Linfomas no hodgkinianos	4.932	Tiroides	4.180
Mieloma	1.861	Linfoma de Hodgkin	652
Leucemias	3.575	Linfomas no hodgkinianos	4.256
Otros	9.215	Mieloma	1.337
Todos excepto piel no melanoma	160.198	Leucemias	2.667
		Otros	7.136
		Todos excepto piel no melanoma	117.196

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Figura 3. Incidencia por cáncer de colon y recto en España en función del sexo estimada para el año 2020 según estimación de REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer) (Las cifras del cáncer en España 2020).

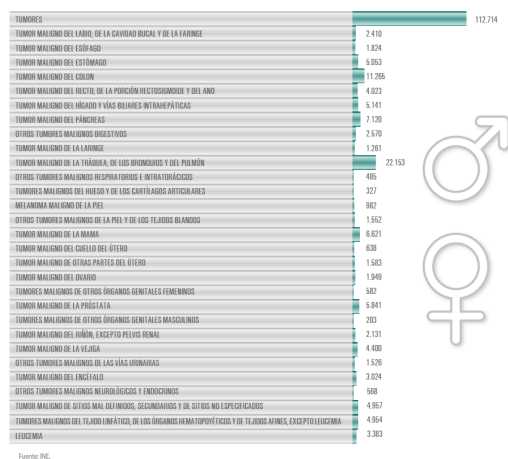


Figura 4. Mortalidad por cáncer de colon y recto en España en función del sexo en el año 2018 según datos proporcionados por el INE (Las cifras del cáncer en España 2020).

1.2.2. Factores de riesgo

Se han reconocido varios factores de riesgo para desarrollar un CCR, entre los que destacan la enfermedad inflamatoria intestinal, el consumo de tabaco y alcohol, el consumo de carne roja y carnes procesadas, la diabetes mellitus, el sedentarismo, el sobrepeso y la obesidad, o el déficit de vitamina D, de tal manera que el suplemento de vitamina D y calcio podría disminuir la incidencia de pólipos adenomatosos y de CCR. La adherencia a hábitos de vida saludables (evitar el sobrepeso, actividad física regular, abstinencia de tabaco y alcohol y una dieta de estilo mediterráneo) se ha asociado a una reducción de la incidencia de CCR (12)(13)(14). Asimismo, el ácido acetil-salicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos a dosis bajas se han asociado con un menor riesgo de CCR (15). Alrededor del 20% de los casos de CCR se asocian con antecedentes familiares

de CCR, de los cuales aproximadamente la mitad lo hacen en el seno de trastornos hereditarios como el síndrome de Lynch (herencia autosómica dominante (AD)), la poliposis adenomatosa familiar (herencia AD) o la poliposis atenuada (herencia autosómica recesiva), cada uno de ellos debido a alteraciones genéticas diferentes (16)(17). El síndrome de Lynch, es responsable de un 4-5% de los casos de CCR, y se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes del *mismatch repair* (MMR, por sus siglas en inglés), que constituye uno de los principales mecanismos para la reparación del ADN, condicionando un aumento del riesgo de CCR y otros cánceres digestivos, cánceres ginecológicos y cáncer de la vía urinaria, si bien se han descrito también, aunque menos frecuentemente, cánceres de otras localizaciones como gliomas, cánceres de mama o incluso sarcomas. Los genes del MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 y EPCAM) se asocian a inestabilidad de microsatélites y se caracterizan por acumular un gran número de mutaciones, denominándose por ello tumores “hipermutados” o con una elevada carga mutacional (Tumor Mutational Burden ó TMB, en su terminología anglosajona). Esta particularidad es importante, ya que los convierte en tumores fácilmente identificables por el sistema inmunológico y donde la inmunoterapia, como se comentará más adelante, juega un papel importante (18)(19).

1.2.3. Biología molecular del cáncer colorrectal

Aproximadamente el 75% de los CCR se asocian a fenotipos moleculares “drogables”, donde el tratamiento con fármacos dirigidos contra dianas específicas, conlleva un impacto en la supervivencia de los pacientes (20). Las mutaciones en KRAS, NRAS (RAS^{MUT}) o BRAF ($BRAF^{MUT}$) condicionan la activación constitutiva de la vía de RAS/BRAF/ERK por debajo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) impidiendo por tanto su inhibición mediante el empleo de agentes dirigidos contra EGFR. Por ello, en el CCR metastásico (CCRm) RAS^{MUT} , y dada la importancia del proceso de neovascularización en esta entidad, la QT suele combinarse con agentes antiangiogénicos como bevacizumab y nunca con agentes anti-EGFR. Por el contrario, los tumores RAS (RAS^{NAT}) y BRAF nativos ($BRAF^{NAT}$) si obtienen beneficio del tratamiento con los agentes anti-EGFR y forman parte fundamental de los esquemas de QT actuales (20). El 4-10% de los CCR RAS^{NAT} se asocian a mutaciones en BRAF ($BRAF^{MUT}$), y se ha demostrado que la combinación de QT con el agente anti-EGFR cetuximab y el inhibidor de BRAF vemurafenib mejoran la tasa de respuestas y la supervivencia (21).

Asimismo, el 2% de los CCR tienen amplificación de Her2, y se dispone ya de resultados de dos ensayos clínicos en donde la combinación de QT convencional con agentes anti-Her2 se asoció a una mayor tasa de respuestas y a un incremento en la supervivencia (22)(23). Algo menos de un 2% de los CCR pero cerca de un 20% de los CCR refractarios al tratamiento anti-EGFR tienen amplificaciones de MET, que mediante el empleo de inhibidores específicos podrían servir para revertir la resistencia a los anti-EGFR (24). Más raramente (1% de los casos), en el CCR RAS^{NAT} pueden detectarse reordenamientos o fusiones de ALK, ROS1, NTRK1, NTRK2 y NTRK3, que justifican el empleo de los inhibidores de NTRK (Véase **Tabla 1**) (25)(26).

La inestabilidad de microsatélites asociada a mutaciones en los genes reparadores del “mismatch” (MMR), y las mutaciones en POL-E y POL-D -que al contrario que en el síndrome de Lynch, no se asocian a inestabilidad de microsatélites- condicionan la aparición de cánceres hipermutados o ultramutados, respectivamente, y predicen la respuesta a los tratamientos inmunoterápicos contra el eje PD1/PDL1 de los linfocitos T (19). En línea con estos resultados, las guías NCCN y ASCO recomiendan testar la inestabilidad de microsatélites en todos los pacientes con CCR independientemente de la edad al diagnóstico (27)(28)(28).

Por último, un consorcio internacional describió recientemente una clasificación molecular del CCR definiendo 4 tipos moleculares diferentes, asociados a pronósticos diferentes: el “Consensus Molecular Subtype 1” ó CMS1 (subtipo MSI immune) caracterizado por ser tumores hipermutados, con inestabilidad de microsatélites y una importante activación inmunológica; CMS2 (subtipo canónico), caracterizado por un genotipo epitelial, con inestabilidad cromosómica y activación de las vías de WNT y MYC; CMS3 (subtipo metabólico), caracterizado también por un genotipo epitelial, con importantes alteraciones en vías metabólicas; y CMS4 (subtipo mesenquimal), donde predominan la activación del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), la invasión estromal y la angiogénesis. Los subtipos CMS2 y CMS1 son los asociados a un mejor y peor pronóstico, respectivamente. Esta clasificación, aun gozando de amplio consenso en la comunidad científica, no se emplea aún en la práctica clínica, debido, entre otros aspectos, a la complejidad de los análisis necesarios y a sus costes (Véase **Tabla 2**) (29).

Tabla 1. Alteraciones moleculares más frecuentes en el cáncer colorrectal (CCR) y tratamientos dirigidos.

Tipo de alteración	Frecuencia	Agentes dirigidos	Características más relevantes
Mutación KRAS o NRAS	45-55%	Antiangiogénicos (bevacizumab, aflibercept)	Resistencia a anti-EGFR
Mutación BRAF	8-10%	Inhibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib)	Deben combinarse con inhibidores de MEK y anti-EGFR para bloquear todas las vías de escape
Amplificación HER2	2%	Anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab, TDM1)	Trastuzumab es el único que tiene evidencia clínica en CCR
Amplificación MET	< 2% de novo 20% adquirida en CCR resistente a anti-EGFR	Inhibidores de MET (iMET) en desarrollo	No evidencia clínica del empleo de iMET en CCR
Fusiones de ALK, ROS1, NTRK 1-3	1%	Inhibidores de NTRK (entrectinib, larotrectinib, alectinib, crizotinib)	Tasa de respuestas muy alta con claro impacto en supervivencia
Mutación en genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) Inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H)	4%	Anti-PD1 +/- Anti-CTLA4 (pembrolizumab, nivolumab +/- ipilimumab)	Tumores “hipermutados” Alta tasa de respuestas e impacto en supervivencia
Mutaciones en POLE y POLD	1%	Anti-PD1 +/- Anti-CTLA4 (pembrolizumab, nivolumab +/- ipilimumab)	Tumores “ultramutados” sin inestabilidad de microsatélites (MSS) Alta tasa de respuestas e impacto en supervivencia

Modificado de Dientsmann R, et al. Molecular Subtypes and Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2018;38:231-238 (20). Para más información véase texto principal y resto de referencias (19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)(29).

Tabla 2. Grupos de la clasificación del Consensus Molecular Subtypes (CMS) para el Cáncer Colorectal (CCR).

Grupo CMS	Frecuencia	Características biológicas	Terapias propuestas*
CMS 1	10%	Subtipo MSI-like Importante infiltración y activación inmune	Anti-PD1, Antiangiogénicos
CMS 2	40%	Subtipo canónico Genotipo epitelial con activación vías WNT y MYC	Anti-EGFR ¿?
CMS 3	15%	Subtipo metabólico Genotipo epithelial con multiples alteraciones metabólicas	¿?
CMS 4	28%	Subtipo mesenquimal ó TGF-β activado Activación de la vía de TGF-β y de la angiogénesis	Inhibidores de TGF-β, antiangiogénicos ¿?
Mixto	7%	¿?	¿?

*No existe evidencia por el momento para recomendar su uso, sino que son solo propuestas a ser estudiadas en base a un racional biológico. Para más información véase texto principal y referencias (29).

1.2.4. Estadificación

En el año 2017, la American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicó la 8ª y última edición del manual de estadificación que se basa en las categorías T (tumor), N (ganglios regionales) y M (metástasis a distancia). Este sistema de estadificación, reconoce diferentes estadios en función del pronóstico. Respecto al sistema de estadificación de la 7ª edición (2010), ahora se incluyen tres subcategorías dentro de la fase metastásica: M1a (metástasis en un único órgano), M1b (metástasis > 1 órgano o sistema), y M1c (carcinomatosis peritoneal, con o sin metástasis en otras localizaciones). En esta nueva edición no hubo cambios en las categorías T ni N (30). Se considera que la resección de al menos 12 ganglios es necesaria para una correcta estadificación de la N (número de ganglios linfáticos locoregionales afectados), de tal manera que aquellos pacientes con < 12 ganglios resecados, tienen mayor riesgo de recaída y mortalidad particularmente en las categorías T3 y T4. Los depósitos tumorales extraganglionares, peritumorales o satélites, así como la presencia de invasión perineural, se consideran también factores de alto riesgo para la recaída, que, al igual que el número de ganglios resecados y la T, se tienen en cuenta a la hora de valorar el riesgo y de decidir el tratamiento adyuvante con quimioterapia en los pacientes con estadio II (30)(31)(32).

1.2.5. Manejo de las lesiones premalignas

Las guías norteamericanas NCCN recomiendan, para la población general, la realización de una colonoscopia o de un test de sangre oculta en heces (SOH) a partir de los 50 años y en este último caso si resulta positivo, la realización de una colonoscopia. Esta segunda estrategia es, actualmente, la más empleada en España. Si se encuentran pólipos de tipo adenomatoso se recomienda la repetición de la colonoscopia en 1 a 3 años dependiendo del tipo de pólipo adenomatoso. Si la colonoscopia es normal, se debe continuar con test de SOH anuales, o bien realizar una colonoscopia a los 5-10 años. Caso distinto, es el de aquellas personas en riesgo, por antecedentes familiares de CCR con < 50 años o diagnosticados de un síndrome hereditario de predisposición al CCR, como el síndrome de Lynch, o una poliposis, en cuyo caso el inicio del screening se deberá iniciar en la mayoría de los casos entre los 20 y los 30 años con colonoscopia anual o incluso más frecuentemente en función de los hallazgos (33).

1.2.6. Manejo del cáncer colorrectal en estadios localizados

Un pólipo malignizado es un CCR que invade la submucosa (pT1) y, si se consigue extirpar completamente mediante colonoscopia con un margen de al menos 2 mm y no tiene otros criterios de riesgo, no precisa cirugía. En caso de márgenes afectos o a < 2 mm, u otros factores histopatológicos de mal pronóstico (alto grado, invasión linfovascular, etc) se recomienda la colectomía con resección en bloque de los ganglios regionales (34). En los casos de CCR no diagnosticados sobre pólipos se debe realizar una colectomía cuya extensión dependerá de la localización (sigmoidectomía en tumores de sigma, y hemicolectomías izquierda o derecha en los tumores de colon descendente o ascendente y transversal, respectivamente) con la resección en bloque de los ganglios linfáticos locoregionales, procurando resecar al menos 12 gánglios en total (35)(35). Tras la cirugía, los CCR en estadio I (T1 o T2, N0, M0) o en estadio II sin factores de riesgo (T3, N0, M0), no requieren de tratamiento adyuvante, recomendándose únicamente la vigilancia. Existe controversia respecto a si los pacientes con CCR en estadio II con algún factor de riesgo (borde afecto, resección de < 12 gánglios, T4, invasión perineural o linfovascular, pobremente diferenciado, o tumor perforado u obstruido), deben recibir quimioterapia adyuvante. Algunos autores proponen la edad, y marcadores como la inestabilidad de microsatélites para ayudar en la decisión y guías clínicas como las NCCN contemplan la posibilidad de adyuvancia con FOLFOX o CAPEOX durante 6 meses. Los tumores con MSI en estadio II (no está aún claro si también para los estadios III), se asocian a un pronóstico significativamente mejor que aquellos con MSS, de tal manera que en ausencia de otros factores de riesgo (el grado de diferenciación no se tiene en cuenta como factor de riesgo en los tumores con MSI ya que no predice un peor pronóstico en estos casos), no se recomienda el tratamiento adyuvante (36). Mientras que las plataformas genómicas en tejido (Oncotype DX Colon Cancer, ColoPrint, ColoDx) no han demostrado utilidad para orientar la indicación de QT adyuvante, la biopsia líquida sí podría resultar una herramienta útil tanto en estadios II de alto riesgo como en estadios III, al haberse demostrado recientemente que el ADNtc es capaz de detectar la enfermedad mínima residual en el CCR (27)(37).

El estudio francés IDEA comparó 3 vs 6 meses de QT adyuvante (el 90% de los pacientes recibieron mFOLFOX6 y el 10% CAPOX) en pacientes con CCR estadio III, demostró una mejor supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el brazo de 6 meses de tratamiento,

si bien el estudio de subgrupos apenas encontró diferencias entre 3 y 6 meses de mFOLFOX6 en los estadios III de bajo riesgo (T1-T3, N1, M0), y si en los de alto riesgo (T4 y/o N2) (38). Un análisis de 6 ensayos en fase III comparó la SLE a 3 años en pacientes con CCR estadio III tratados con FOLFOX o CAPOX por 3 vs 6 meses. Aunque el estudio no demostró la no inferioridad de 3 vs 6 meses de QT, especialmente a expensas del subgrupo de alto riesgo (T4 y/o N2), en el subgrupo tratado con CAPOX, la SLE fue similar entre 3 o 6 meses de tratamiento (39). Por ello, guías como las NCCN, recomiendan, en los pacientes con CCR en estadio III de alto riesgo, la adyuvancia durante 6 meses con FOLFOX, CAPEOX ó, en pacientes frágiles, capecitabina sola, debiendo iniciarse a las 4-8 semanas de la cirugía (27).

Mención aparte merece el manejo del cáncer de recto en estadios localizados (40).

En los tumores de recto en fase muy temprana (cada vez más frecuentes debido a los programas de detección precoz) (T1 o T2, N0), < 4 cm, situados no más allá de 8 cms desde el margen anal y que afectan a < 30% de la circunferencia, y sin evidencia de afectación ganglionar, se recurre a la resección transanal o a la microcirugía endoscópica transanal considerándose como márgenes libres si estos son > 3 mm. En un análisis de 927 tratamientos, la microcirugía endoscópica transanal se asoció a una mayor tasa de márgenes libres, menor fragmentación del espécimen resecado y menor recurrencia local que la excisión transanal. En caso de factores histopatológicos de alto riesgo, se recomienda una resección más amplia (41). En caso de tumores más avanzados (\geq T2, ó N+) se debe realizar la extirpación transabdominal que permite además la correcta estadificación ganglionar. Se debe realizar la extirpación mesorrectal total (EMT) que incluye la resección en bloque del mesorrecto con las estructuras vasculares y linfáticas, tejido adiposo y fascia mesorrectal pero sin afectar a los nervios autónomos, pudiendo proceder luego a la anastomosis colorrectal si el ano y el área rectoanal se han podido preservar. En los tumores del recto medio o alto se debe realizar una resección anterior baja hasta 4-5 cm por debajo del margen distal del tumor empleando la EMT seguida de una anastomosis colorrectal siempre que sea posible, dejando, en caso contrario, una colostomía de descarga (40). En los últimos 5 años se han publicado varios trabajos comparando nuevas técnicas quirúrgicas, que parecen asociarse a resultados similares a la cirugía abierta, pero con menor morbilidad. En un meta-análisis de 14 estudios no aleatorizados en que se incluyó a cerca de 1000 pacientes, se compararon la EMT por

vía transanal (EMT-TA) y por vía laparoscópica (EMT-LP), asociándose la EMT-TA a menos tiempo de hospitalización y reingresos, menor morbilidad global y grave, menos fugas anastomóticas y menor afectación del margen de resección circunferencial (42). En caso de afectación tumoral del esfínter anal o de los músculos elevadores, se realizará una amputación abdómino-perineal (resección en bloque del recto-sigma, recto, ano, mesenterio circundante, mesorrecto, y tejidos blandos perianales) con EMT y colostomía de descarga (40)(43). Existe un alto riesgo de recidiva locoregional en el cáncer de recto, debido, entre otros, a su proximidad a otras estructuras pélvicas, a la ausencia de serosa y a las dificultades técnicas para conseguir una resección quirúrgica con márgenes amplios. Además, las pruebas de imagen actuales (RM, endoscopia por ultrasonidos) pueden infraestimar el grado de afectación local y sobre todo ganglionar. Por todo ello, se recomienda el tratamiento con quimioradioterapia (QTRT) preoperatoria en los casos de tumores T3-T4 ó N+, es decir a la mayoría de los pacientes con tumores en estadios II y III. En un estudio en fase III, en 392 pacientes tratados con QT-RT, la capecitabina demostró la no inferioridad en cuanto a supervivencia a 5 años, recaídas locoregionales y a distancia frente a 5FU (44). En resumen, la QTRT preoperatoria tiene varias ventajas, como la citorreducción tumoral para facilitar la resección quirúrgica, aumentar la tasa de preservación del esfínter anorectal, y evitar la radioterapia postoperatoria que se asocia a una mayor morbilidad. El añadir quimioterapia con efecto radiosensibilizante, permite incrementar la tasa de respuestas completas patológicas (RCP) y la tasa de preservación del esfínter, reduciendo asimismo la tasa de recaída local (40)(44). Los esquemas de RT habitualmente empleados en el contexto preoperatorio contemplan la administración de 50.4 Gy en fracciones de 1.8 Gy durante 5.5 semanas (45). Por otra parte, se recomienda que la cirugía se lleve a cabo en el intervalo de entre 5 y 11 semanas tras finalizar la QT-RT, aunque, como se demostró en el estudio GRECCAR-6, si bien la cirugía en la semana 11 vs 7 no se asoció a una tasa de RCP diferente, si hubo una mayor morbilidad y una EMT de peor calidad a la semana 11 post-QTRT (40)(46).

Generalmente, la RT de ciclo corto (25 Gy en 5 fracciones de 5 Gy cada una, y sin quimioterapia radiosensibilizante), se limita a pacientes especialmente frágiles o con comorbilidades importantes, o en casos de enfermedad oligometastásica donde interesa un control local rápido y proceder a cirugía de las metástasis y del tumor

primario cuanto antes. En un estudio de 326 pacientes aleatorizados en proporción 1:1 a recibir RT de ciclo corto vs QTRT de ciclo largo con 5FU concomitante, no hubo diferencias en la tasa de recaída locoregional a 3 años ni en SG a 5 años, si bien para tumores distales la RT de ciclo corto se asoció a una, no significativa, mayor tasa de recaída local (45).

El tratamiento con QTRT preoperatoria en el cáncer de recto consigue la infraestadificación en el 50-60% de los pacientes, y aproximadamente el 20% alcanza una RCP. Varios estudios han demostrado una mejoría en la SLR y en la SG a mayor grado de respuesta patológica. En un estudio de 725 pacientes con cáncer de recto cT3-4 ó cN+, la RCP se asoció a una SLR a 5 años del 90.5% vs 78.7% y 58.5% en aquellos con una respuesta intermedia (ypT1-2N0) o pobre (ypT3-4 ó N+), respectivamente (47). En el estudio CAO/ARO/AIO-94, se estudió, retrospectivamente, el grado de regresión tumoral, es decir la grado de celularidad tumoral viable, en 386 pacientes, y aquellos con escasos signos de regresión tumoral (TRG0, TRG1) tuvieron una SLR a 10 años significativamente peor (48).

Aunque los datos existentes para recomendar la QT adyuvante tras el tratamiento con QTRT preoperatoria y cirugía son limitados, en general se recomienda que todos los pacientes, independientemente de la respuesta histopatológica alcanzada, reciban QT adyuvante. En el estudio en fase II ADORE en pacientes con cáncer recto con respuesta post-operatoria ypT3-4 ó N+, la QT adyuvante con FOLFOX incrementó de manera significativa la SLR a 3 años frente a 5FU-LV (71.6% vs 62.9%, $p=0.047$), si bien el brazo con oxaliplatino se asoció a mayor toxicidad (neutropenia, trombopenia, náuseas y neuropatía periférica) (49). No existe un claro consenso en cuanto al tipo de QT adyuvante a administrar o su duración (50). Sastre y colaboradores (50), en un estudio en 101 pacientes, demostraron la utilidad de individualizar la QT adyuvante (fluoropirimidinas solas vs combinaciones de oxaliplatino y fluoropirimidinas), en función de la respuesta obtenida tras la QTRT. En resumen, se recomiendan tratamientos más intensivos (FOXFOX, CAPEOX durante 6 meses) en casos de respuesta intermedia o mala, y tratamientos menos intensivos (capecitabina durante 4-6 meses) en casos de muy buena respuesta (RCP) al tratamiento QTRT (40)(50).

1.2.7. Manejo del cáncer colorrectal en estadio avanzado o metastásico

1.2.7.1. Primera línea

Alrededor de la mitad de los pacientes con CCR desarrollarán metástasis, la mitad de ellos como una recaída tras el tratamiento de la enfermedad localizada, y la otra mitad como debut de la enfermedad. El 20-30% de los pacientes con enfermedad avanzada tendrán exclusivamente metástasis en el hígado y el 50% de las recaídas tras un tratamiento curativo estarán limitadas al hígado. Globalmente, el 85% de los pacientes metastásicos tendrán metástasis hepáticas irresecables, siendo estas la causa de la muerte en > 50% de los casos (51). En casos seleccionados se puede plantear el tratamiento local de las metástasis con intención curativa, alcanzando tasas de supervivencia a 5 años del 25-40% tras la resección de enfermedad hepática (51). Sin embargo, la mayoría de los pacientes no serán candidatos y el único tratamiento será la QT sistémica paliativa.

El tipo de tratamiento sistémico a emplear dependerá de la edad, comorbilidades y tratamientos previos recibidos, así como de la biología molecular del tumor. Los esquemas terapéuticos empleados en la 1ª línea están basados en fluoropirimidinas combinadas o no con otros quimioterápicos y con agentes biológicos. Los esquemas más empleados son FOLFOX6 modificado (mFOLFOX6), CAPEOX, capecitabina en monoterapia, FOLFIRI, y en pacientes no ancianos con buen estado general FOLFOXIRI. Todos ellos se suelen combinar con agentes dirigidos bien frente a la angiogénesis (bevacizumab, ziv-aflibercept) o contra la vía de EGFR (cetuximab, panitumumab) incrementando de manera significativa su eficacia. No parecen existir diferencias entre el tipo de fluoropirimidina a emplear (27).

En el estudio GERCOR, no hubo diferencias en cuanto a eficacia entre empezar con esquemas con oxaliplatino o irinotecan (FOLFOX / CAPEOX ó FOLFIRI), si bien el perfil de toxicidad fue diferente. Así, la decisión de qué esquema de QT emplear en 1ª línea dependerá del tipo de biológico a combinar, del perfil de toxicidad que mejor se adapte al paciente, y de la estrategia terapéutica global a largo plazo en cada caso (27)(52). En el estudio NO16966, de 2034 pacientes, se demostró la no inferioridad de XELOX frente a FOLFOX-4 en la 1ª línea (53).

En el estudio japonés WJOG4407G, se comparó en 402 pacientes la 1ª línea con FOLFIRI-bevacizumab frente a mFOLFOX6-bevacizumab, demostrándose la no inferioridad de FOLFIRI-bevacizumab en SLP (12.1 m vs 10.7 m, $p=0.003$) (54). En el estudio TRIBE, del grupo italiano GONO, se comparó el tratamiento de 1ª línea con FOLFOXIRI-bevacizumab frente a FOLFIRI-bevacizumab, encontrándose un incremento estadísticamente significativo a favor de FOLFOXIRI-bevacizumab en SLP (12.1 vs 9.7 m, $p=0.003$), SG (29.8 vs 25.8 m, $p=0.03$) y tasa de respuestas (65% vs 53%, $p=0.006$). Este beneficio fue mayor en los tumores RAS y BRAF nativos frente a los RAS mutados y BRAF mutados (SG: 37.1 m vs 25.6 m vs 13.4 m)(55). En el congreso de ASCO 2019, se presentaron los resultados del estudio TRIBE2, demostrándose que el tratamiento de 1ª línea con FOLFOXIRI-bevacizumab seguido, en el momento de la progresión, por la reintroducción del mismo esquema, incrementaba la SLP1 (12 vs 9.8 m, $p<0.001$), SLP2 (19.1 vs 16.4 m, $p<0.001$) y la SG (27.6 vs 22.6 m, $p=0.003$), frente al mismo planteamiento secuencial con FOLFIRI-bevacizumab o FOLFOX-bevacizumab, en una población de especial mal pronóstico (65% RAS mutado, 10% BRAF mutado, 89% metástasis sincrónicas, 38% colon derecho) (56). Por último, también en el mismo congreso de ASCO 2019, se presentaron resultados del estudio VISNÚ 1, del grupo español TTD, en el cual se comparó la 1ª línea con FOLFOX-bevacizumab frente a FOLFOXIRI-bevacizumab en pacientes con ≥ 3 CTC detectadas basalmente mediante el sistema CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems). El tratamiento con FOLFOXIRI-bevacizumab demostró incrementar de forma significativa la SLP (12.4 vs 9.3 m, $p=0.0004$), y también, aunque sin alcanzar la significación estadística, la tasa de respuestas (59% vs 52%, $p=0.1685$) y la SG (21.7 vs 17.6 m, $p=0.862$) (57).

Por último, en pacientes frágiles o ancianos con CCR es importante disponer de esquemas menos tóxicos pero eficaces. En el estudio AVEX, en 280 pacientes con CCRm cuya mediana de edad estuvo en 76 años (70-87) el tratamiento con capecitabina-bevacizumab alcanzó una SLP significativamente más larga que el de capecitabina sola (9.1 m vs 5.1 m, HR 0.53, $p<0.0001$), siendo una combinación bien tolerada (58).

1.2.7.1.1. Estatus mutacional de RAS/BRAF, lateralidad del tumor primario y tratamientos biológicos

Las mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de KRAS y en los exones 2, 3 y 4 de NRAS se asocian a la ausencia de respuesta, y posiblemente a un efecto deletéreo del tratamiento con anti-EGFR (cetuximab, panitumumab) (59)(60)(61)(62)(63). Mientras que las mutaciones en KRAS y NRAS están presentes en el 45-55% de los CCR, entre el 8 y el 10% tienen mutaciones en BRAF. Las mutaciones en RAS y BRAF se consideran mutuamente excluyentes. Los CCR BRAF mutados tienen un claro peor pronóstico que los BRAF nativos, y tampoco responden al tratamiento con anti-EGFR, al encontrarse la vía del EGFR constitutivamente activada (20)(27)(60). Por último, la sobreexpresión o amplificación de Her2 parece asociarse también a la resistencia al tratamiento con agentes anti-EGFR (64).

Varios estudios han demostrado que los pacientes con tumores de origen en el colon izquierdo tienen una supervivencia significativamente más larga que los de origen en el colon derecho (65)(66)(67)(68)(69)(70). En los pacientes con CCR RAS + BRAF nativos, varios ensayos clínicos y meta-análisis han demostrado el beneficio en supervivencia de la combinación de quimioterapia con agentes anti-EGFR tanto en 1ª como en 2ª línea. Sin embargo, este beneficio parece estar limitado a aquellos casos en los que el CCR se originó en el colon izquierdo o recto. Aún siendo tumores RAS y BRAF nativos, los de origen en el colon derecho, no parecen beneficiarse por el tratamiento con anti-EGFR ni en 1ª ni en sucesivas líneas (27)(68)(69)(70).

Tejpar y colaboradores (68), en un análisis retrospectivo de los estudios CRYSTAL y FIRE-3, ambos realizados en pacientes con CCRm RAS^{NAT}, encontraron que la SG, SLP y TRO fueron significativamente mayores en los pacientes con tumores de origen en el colon izquierdo, especialmente cuando se trataron con anti-EGFR (cetuximab) frente a anti-VEGF (bevacizumab). Sin embargo, en los tumores de origen en el colon derecho el beneficio de la QT con cetuximab fue pequeño al compararlo con la QT con bevacizumab en el estudio CRYSTAL, mientras que no se encontraron diferencias en el estudio FIRE-3. En un meta-análisis de estudios de primera línea en CCRm, el pronóstico de los tumores de origen en el colon izquierdo fue significativamente mejor que los de origen en el colon derecho. El meta-análisis de los estudios PRIME y CRYSTAL y el de los estudios FIRE-3, CALGB/SWOG 80405 y PEAK demostraron una mayor supervivencia en los

pacientes RAS^{NAT} con primarios de colon izquierdo tratados con QT + anti-EGFR, mientras que los pacientes con primarios de colon derecho obtuvieron un beneficio numéricamente mayor por el tratamiento con QT + anti-VEGF (67). En un análisis post-hoc del estudio TRIBE en pacientes tratados con FOLFIRI-Bevacizumab vs FOLFOXIRI-Bevacizumab, observaron que los tumores del colon derecho se asociaban a un pronóstico significativamente peor que los de colon izquierdo, obteniendo un mayor beneficio del tratamiento de intensificación con FOLFOXIRI-Bevacizumab y siendo esto independiente del estatus de RAS (65). Véase **Tabla 3**.

Tabla 3. Diferencias observadas en supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los estudios de referencia en función de la lateralidad del tumor primario.

				SG		SLP	
Estudio	Población	Tratamiento	N total (% de colon D)	D	I	D	I
PROVETTA (66)	NS	QT +/- BEV	N=200 (28%)	24.8 m vs 42.0 m (p<0.001)		9.9 m vs 12.1 m (p<0.001)	
AVF2107g (66)	NS	QT +/- BEV	N=559 (36.9%)	14.6 m vs 20.4 m (p<0.001)		7.1 m vs 8.5 m (p<0.001)	
NO16966 (66)	NS	QT +/- BEV	N=1268 (26.3%)	18.0 m vs 23.0 m (p<0.001)		7.6 m vs 8.9 m (p=0.12)	
CRYSTAL (68)	RAS ^{NAT}	FOLFIRI +/- CETU	N=364 (23.1%)	N=84 18.5 vs 15 m (p=0.76)	N=280 28.7 vs 21.7 m (p=0.002)	N=84 8.1 vs 7.1 m (p=0.66)	N=280 12.0 vs 8.9 m (p<0.001)
FIRE-3 (68)	RAS ^{NAT}	FOLFIRI-CETU vs FOLFIRI-BEV	N=394 (22.3%)	N=88 18.3 vs 23.0 m (p=0.28)	N=306 38.3 vs 28.0 m (p=0.002)	N=88 7.6 vs 9.0 m (p=0.11)	N=306 10.7 vs 10.7 m (p=0.09)
PRIME (70)	RAS/BRAF ^{NAT}	FOLFOX +/- PANI	N=416 (21.2%)	N=124 22.5 vs 21.5 m (p=0.9295)	N=435 32.5 vs 23.6 m (p=0.0027)	N=124 8.9 vs 7.3 m (p=0.326)	N=435 12.9 vs 9.3 m (p=0.0028)
CALGB/SWOG 80405 (69)	KRAS ^{NAT}	FOLFOX/FOLFIRI-CETU vs FOLFOX/FOLFIRI-BEV	N=474 (31.4%)	19.4 m vs 34.2 m (p<0.0001)		8.9 m vs 11.5 m (p=0.002)	
CALGB/SWOG 80405 (69)	KRAS ^{MUT}	FOLFOX/FOLFIRI-CETU vs FOLFOX/FOLFIRI-BEV	N=474 (31.4%)	23.1 m vs 30.3 m (p<0.0001)		-	
PEAK (70)	RAS/BRAF ^{NAT}	FOLFOX-PANI vs FOLFOX-BEV	N=143 (25.2%)	N=36 22.5 vs 23.3 m (p=0.3326)	N=107 43.4 vs 32.0 m (p=0.2945)	N=36 10.3 vs 12.6 m (p=0.8092)	N=107 14.6 vs 11.5 m (p=0.0514)
TRIBE (65)	POBLACIÓN GLOBAL	FOLFIRI-BEV vs FOLFOXIRI-BEV	N=358 (32%)	N=116 20.2 vs 26.0 m (p=0.03)	N=242 31.6 vs 28.6 m (p=0.03)	N=116 9.4 vs 11.2 m (p=0.099)	N=242 11 vs 10.7 m (p=0.89)
TRIBE (65)	RAS/BRAF ^{NAT}	FOLFIRI-BEV vs FOLFOXIRI-BEV	N=358 (32%)	N=25 22.3 vs 31.5 m (p=0.165)	N=99 37.7 vs 40 m	N=25 10.1 vs 13.4 m (0.292)	N=99 11.5 vs 14.1 m
TRIBE (65)	RAS ^{MUT}	FOLFIRI-BEV vs FOLFOXIRI-BEV	N=358 (32%)	N=76 20.5 vs 26.3 m	N=133 25.6 vs 27.2 m	N=76 9.6 vs 11.0 m	N=133 9.6 vs 12.5 m

(-): no disponible. BEV: bevacizumab, CETU: cetuximab, D: colon derecho, I: colon izquierdo, m: meses, MUT: mutado, N: número de casos, NAT: nativo, NS: población no seleccionada por estatus de biomarcador (KRAS, NRAS y/o BRAF), QT: quimioterapia, PANI: panitumumab, SG: supervivencia global, SLP: supervivencia libre de progresión.

El tratamiento con FOLFIRI-panitumumab se considera aceptable en 1ª línea, si bien los datos de eficacia proceden de su empleo en 2ª línea (71).

En el estudio PRIME, la combinación de FOLFOX-panitumumab en 1ª línea frente a FOLFOX solo, en tumores KRAS nativos demostró incrementar la SLP (HR 0.72, IC95% 0.58-0.90, $p=0.004$) y la SG (HR 0.77, IC95% 0.64-0.94, $p=0.009$) (61). Por el contrario, varios estudios han testado esquemas con oxaliplatino combinados con cetuximab, y en general no han conseguido demostrar impacto en supervivencia en la 1ª línea, por lo que el empleo de esta combinación no suele recomendarse (27)(72).

Por último, en pacientes con CCR asociados a síndrome de Lynch o CCR con inestabilidad de microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés), se han publicado varios estudios que demuestran la utilidad de la inmunoterapia con agentes anti-PD1 (27). En un estudio en fase II, el agente anti-PD1 pembrolizumab demostró una tasa de respuestas del 40% en los 10 pacientes con CCRm asociado a MSI frente a un 0% en los 18 pacientes con CCRm MSS (microsatélites estables, por sus siglas en inglés) (18). Estos resultados vinieron se confirmaron en un segundo estudio en pacientes con MSI y CCRm y en otros tipos de cáncer (19). En el estudio CheckMate-142 el tratamiento con nivolumab en monoterapia alcanzó una tasa de respuestas del 31% y una SLP a 12 meses del 50%, y la combinación de nivolumab con el anti-CTLA4 ipilimumab, demostró un tasa de respuestas del 55% con una SLP y SG a los 12 meses del 71% y 85%, respectivamente. Aunque la tolerancia a estos tratamientos suele ser buena, no debe olvidarse su particular perfil de efectos secundarios, por su mecanismo inmuno-mediado con tasas de toxicidad G3-5 de entre el 20% y el 40% (73).

1.2.7.1.2. Terapia de mantenimiento

La terapia de mantenimiento consiste en que tras alcanzar una respuesta al tratamiento estándar con quimioterapia combinada con un agente biológico, se suspende todo o parte del tratamiento quimioterápico manteniendo el tratamiento biológico, para de esa manera alargar la vida útil del tratamiento reduciendo la toxicidad y mejorando la tolerancia y calidad de vida. El estudio CAIRO 3, que aleatorizó a 558 pacientes, demostró que tras alcanzar al menos una estabilización de la enfermedad con CAPOX-bevacizumab, el tratamiento de mantenimiento con capecitabina-bevacizumab

prolongaba la SLP2 (11.7 vs 8.5 m, $p < 0.0001$) y la SG, esta última de manera no significativa ($p=0.06$) frente a observación, siendo mayor la diferencia en SG a favor del mantenimiento en los pacientes con tumor primario resecado y enfermedad metastásica sincrónica (74). Sin embargo, estos resultados no se confirmaron en otro estudio de diseño parecido, el AIO 0207, con 472 pacientes aleatorizados a 3 brazos, pero donde sí se evidenció la no inferioridad del mantenimiento con bevacizumab frente a fluoropirimidinas + bevacizumab (75). En el estudio PRODIGE 9, con 491 pacientes aleatorizados, en el que tras 12 ciclos de FOLFIRI-bevacizumab se continuaba con bevacizumab de mantenimiento u observación, el mantenimiento no mejoró la duración del control de la enfermedad, el intervalo libre de QT, la SLP ni la SG (76). Por último, en el estudio en fase II randomizado MACRO2, se demostró la no inferioridad en SLP y no mostró diferencias en SG ni en tasa de respuestas del mantenimiento con cetuximab frente a continuar con FOLFOX-cetuximab en pacientes tratados con 8 ciclos de inducción de FOLFOX-cetuximab en pacientes con CCR KRAS nativo (77).

1.2.7.1.3. Tratamiento de la enfermedad oligometastásica

Varios estudios han demostrado que el tratamiento quirúrgico de la enfermedad oligometastásica tanto hepática como pulmonar en el CCR incrementa la supervivencia, con entre el 40% y el 70% de pacientes vivos a los 5 años de en el caso de metástasis hepáticas y supervivencia a 5 años de hasta el 71% en el caso de metástasis pulmonares (27)(78)(79)(80). La cirugía es el tratamiento local de elección dados los mejores resultados en supervivencia, pero en caso de no ser el paciente operable la ablación por radiofrecuencia (RFA por sus siglas en inglés) es una alternativa a tener en cuenta (81). La evidencia disponible sobre el tratamiento local de la enfermedad oligometastásica en otras localizaciones es más limitado, recomendándose sólo en casos muy seleccionados (27).

Cuando la enfermedad oligometastásica se limita al hígado y es sincrónica con el diagnóstico del CCR, se plantean varios escenarios posibles: 1) enfermedad metastásica resecable de entrada; 2) enfermedad metastásica potencialmente resecable tras un tratamiento sistémico perioperatorio; 3) enfermedad irresecable (27).

Se considera que la enfermedad hepática es resecable cuando es viable extirpar la totalidad del tumor, con márgenes quirúrgicos suficientes y sin comprometer la reserva

funcional hepática. Cuando no se puede garantizar la resección completa, no está indicada la cirugía, ya que no ha demostrado beneficio (27)(80).

Quimioterapia perioperatoria en la enfermedad hepática resecable

Un meta-análisis que incluyó a 2475 pacientes con enfermedad hepática resecable, demostró que la quimioterapia perioperatoria incrementaba un 23% la SG frente a cirugía sola y un 29% la SLR (82). Sin embargo, en otro meta-análisis de 1098 pacientes, no se observó beneficio en SG de la quimioterapia perioperatoria, aunque en 2 de los 4 ensayos incluidos si se observó incremento en SLE con la adición de quimioterapia (83). En un “pooled analysis” que incluyó 2099 pacientes de 40 cohortes, que incluyó a 962 pacientes tratados con QT perioperatoria sola, 602 con QT + anti-EGFR y a 535 con QT + anti-VEGF. Entre los pacientes con enfermedad resecable la tasa de respuestas fue mayor y la tasa de resección hepática solo ligeramente mayor en el grupo de QT + agentes biológicos siendo el impacto relativamente superior en la enfermedad irresecable de entrada, por lo que en el contexto resecable no se recomienda la adición de agentes biológicos (84).

Terapia de conversión en la enfermedad hepática irresecable

Se debe tener en cuenta que los esquemas con irinotecan o con oxaliplatino pueden producir esteatosis hepática o enfermedad sinusoidal hepática, respectivamente, pudiendo así condicionar el resultado de la cirugía hepática. En un análisis retrospectivo de 788 pacientes, se observó que en los pacientes que habían desarrollado enfermedad sinusoidal hepática y/o esteatosis hepática la incidencia de morbilidad postoperatoria grave y de complicaciones específicas de la cirugía fueron mayores que en aquellos pacientes sin ellas (85). Por ello se debe intervenir tan pronto el tumor sea resecable e idealmente tras 2-3 meses de tratamiento quimioterápico neoadyuvante (27). El tipo de quimioterapia a emplear dependerá de la edad, comorbilidades y del estatus de RAS. Varios estudios en población RAS nativa, han demostrado que la adición de cetuximab o panitumumab al tratamiento quimioterápico con FOLFOX6 o FOLFIRI incrementa la tasa de resecabilidad global, de resecabilidad R0 y la SLR en estos pacientes (86)(87). En el estudio CELIM, se incluyó a 110 pacientes demostrándose que cetuximab en combinación tanto con FOLFOX como con FOLFIRI incrementan la SG y la tasa de conversión (86). El empleo de esquemas de poliquimioterapia más activos como

FOLFOXIRI-bevacizumab, también demostró incrementar la tasa de conversión y de resecabilidad frente a FOLFIRI-bevacizumab, en el estudio TRIBE italiano (55).

Terapia inversa

El debut con enfermedad metastásica hepática potencialmente resecable se puede abordar mediante la resección simultánea o secuencial del tumor primario y metástasis, aunque, en ausencia de síntomas obstructivos o criterios de cirugía urgente del primario, existe una tendencia creciente, a la “terapia inversa”, es decir a la resección de la enfermedad hepática, seguida de la resección del tumor primario en un segundo tiempo, precedido o seguido de 6 meses de quimioterapia (neo)adyuvante perioperatoria preferiblemente con CAPEOX ó FOLFOX (88).

Tratamiento local no quirúrgico

Cuando la resección quirúrgica no es posible por fragilidad o comorbilidades del paciente, o dificultades técnicas para la resección, existen otras modalidades de tratamiento local que han demostrado su utilidad fundamentalmente en el manejo de las metástasis hepáticas, como son la Radioterapia Esteroatáxica Corporal (SBRT, por sus siglas en inglés), la ablación por radiofrecuencia (RFA, por sus siglas en inglés), la quimioterapia intraarterial hepática y la radioembolización con microesferas de Ytrio-90 (89). Estas terapias se recomiendan en pacientes muy seleccionados con enfermedad irresecable, no susceptible de tratamiento sistémico, con enfermedad limitada al hígado. En algunos casos de afectación metastásica limitada al pulmón, tanto la SBRT como la RFA, estudiadas en series retrospectivas, parecen opciones que podrían incrementar la supervivencia en pacientes no candidatos a cirugía (90).

1.2.7.2. Segunda línea y sucesivas

El tratamiento tras la progresión a la 1ª línea, en gran medida va a venir definido por los tratamientos recibidos anteriormente. En general en aquellos pacientes en progresión a una primera línea con anti-EGFR no se opta por continuar el tratamiento con anti-EGFR recomendándose la quimioterapia combinada con antiangiogénicos. Aquellos pacientes RAS + BRAF nativos en progresión a una primera línea sin anti-EGFR, deberán recibir anti-EGFR con o sin quimioterapia. En un estudio en 377 pacientes con CCR KRAS exón 2 nativo, el tratamiento con panitumumab en monoterapia demostró incrementar la SG en la población RAS total nativa frente al mejor tratamiento de soporte (10 vs 6.9 m, HR 0.7, p=0.0135) mientras que los pacientes con mutaciones en RAS no se beneficiaron del

tratamiento con panitumumab (HR 0.99) estando aprobado para pacientes frágiles RAS nativos en 2ª línea (91). Por el contrario, la combinación de FOLFIRI/Irinotecan-panitumumab no demostró incrementar la SG frente a FOLFIRI solo en la 2ª línea en dos estudios randomizados en población RAS nativa (71)(92). En el estudio EPIC, en 1298 pacientes en progresión a una 1ª línea con fluoropirimidinas y oxaliplatino, la combinación de Irinotecan-cetuximab frente a irinotecan solo en 2ª línea no demostró incrementar la SG, si bien la población no estaba seleccionada por el estatus de RAS (93). En el estudio en fase II SWOG S1406, se evaluó en 2ª línea o posterior, la combinación de irinotecan-vemurafenib-cetuximab frente a irinotecan-cetuximab en pacientes con CCR BRAF^{MUT} y RAS^{NAT}. La tasa de control de la enfermedad en el brazo de vemurafenib alcanzó el 67% frente al 22% del brazo control (p=0.001). La SLP fue de 4.4 vs 2.0 m y la tasa de respuestas alcanzó el 16% vs 4% (94)(94).

Por otra parte, varios estudios han demostrado el incremento de la SG al cambiar el esquema de quimioterapia manteniendo el bevacizumab en pacientes con progresión a quimioterapia combinada con bevacizumab en la 1ª línea, siendo esta una estrategia habitual en la práctica asistencial. Asimismo, mantener el bevacizumab en monoterapia tras la progresión se ha asociado a una mayor SG (27)(95)(96)(97).

En el estudio VELOUR, la combinación de FOLFIRI con Ziv-aflibercept, una proteína recombinante dirigida contra el receptor del VEGF, demostró incrementar la SG frente a FOLFIRI-placebo en la 2ª línea (13.5 vs 12.1 m, p=0.003). En el estudio en fase II AFFIRM, no se demostró que la misma combinación impactara en supervivencia en la 1ª línea, por lo que Ziv-aflibercept sólo está aprobado en la 2ª línea en combinación con quimioterapia (98). En el estudio en fase III RAISE, se comparó en 2ª línea la combinación de FOLFIRI con el agente anti-VEGFR2 ramucirumab, frente a FOLFIRI-placebo, demostrándose un incremento en la SG para el brazo de ramucirumab (13.3 vs 11.7 m, p=0.02), estando la combinación aprobada tras la progresión a una línea previa con bevacizumab y oxaliplatino (99). Regorafenib es un inhibidor multikinasa que en 2 ensayos en fase III, en 3ª o sucesivas líneas, en población occidental (CORRECT) y asiática (CONCUR), demostraron incrementar la SG frente a placebo (CORRECT: 6.4 vs 5.0 m, HR 0.77, p=0.055; CONCUR: 8.8 vs 6.3 m, p<0.001) (100)(101), aunque con una toxicidad considerable (EAs G3/4 Regorafenib vs Placebo (CORRECT): 54% vs 14%) para un contexto de elevada fragilidad al tratarse de pacientes muy pretratados.

El trifluridin-tipiracil ó TAS-102 combina el análogo de timidina, trifluridina, con el inhibidor de la timidina-fosforilasa, tipiracil, que impide la degradación de la trifluridina (27). En el ensayo en fase III RECURSE, el tratamiento con TAS-102 demostró incrementar la SG (7.1 vs 5.3 m, HR 0.68, $p < 0.001$) frente a placebo, en pacientes que habían recibido al menos dos líneas previas de tratamiento (102). TAS-102 se asoció a un 38% (vs 0% de Placebo) de neutropenia de grado ≥ 3 y a un 18% (vs 3% de Placebo) de anemia de grado ≥ 3 . El tratamiento con TAS-102 se puede administrar antes o después de Regorafenib. No obstante, la toxicidad de estos dos agentes debe tenerse en cuenta ya que están indicados en pacientes muy pretratados y que en su mayoría son frágiles (27).

1.3. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO: PERSPECTIVA ACTUAL DE SU EPIDEMIOLOGÍA, PROCESO DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

1.3.1. Epidemiología.


Según estimaciones de GLOBOCAN, en el año 2018 a nivel mundial el cáncer de cabeza y cuello (CCC) ocupó el 6º lugar en incidencia -el 7º si se incluye el carcinoma de piel no melanoma- y el 7º en mortalidad entre los tumores sólidos, diagnosticándose 705.000 nuevos casos y produciéndose 358.000 fallecimientos. Por sexos, el CCC ocupó, el 6º lugar en incidencia y el 7º en mortalidad en hombres y el 12º lugar en incidencia y el 16º en mortalidad en mujeres, siendo, por tanto, una enfermedad que afecta mayoritariamente al sexo masculino debido a la mayor exposición a factores de riesgo como el tabaco y el alcohol (8).

El cáncer de labio y cavidad oral, la sublocalización conjunta más frecuente dentro del CCC, ocupó el 1º lugar en incidencia y mortalidad en varones en la India, Pakistán y Afganistán, debido al elevado consumo entre la población, fundamentalmente de sexo masculino, de la hoja y nuez de la areca o palma de betel (considerada como un carcinógeno de clase 1 por la OMS), además de al tabaco y en menor medida al alcohol (8).

Se estima que en USA, en el año 2019, se diagnosticaron 65.000 nuevos casos y se produjeron 15.000 muertes por CCC, constituyendo así el 8º cáncer en incidencia y el 9º en mortalidad. En varones ocupó el 6º lugar en incidencia y el 8º en mortalidad, con 48.000 nuevos casos y 11.000 fallecimientos. En las mujeres fue el 11º cáncer más


frecuentemente diagnosticado y la 13ª causa de muerte por cáncer, con 17.000 casos nuevos y 3.500 muertes (1).

En España, en 2020 se diagnosticarán 11800 nuevos casos de CCC, ocupando el 6º lugar en incidencia. En varones se diagnosticarán 8.900 casos y en mujeres 2.900, siendo el 5º y 10º cáncer en incidencia, respectivamente. Según datos del INE, en el año 2018 hubo 3.700 muertes por CCC en España, ocupando el 10º lugar en mortalidad por cáncer. En varones fue el 8º cáncer en mortalidad con 2900 muertes, y en mujeres ocupó el 13º lugar, con 770 fallecimientos (2). En la **figura 5** se muestra la incidencia del CCC según la estimación de GLOBOCAN extrapolada a la población española para el año 2020. Véase la **figura 6** con los datos de mortalidad estimada para el año 2018 según el INE.



TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	6.049
Esófago	1.908
Estómago	4.703
Colon y recto	26.044
Colon	17.433
Recto	8.611
Hígado	4.971
Vesícula biliar	1.521
Páncreas	4.384
Laringe	2.825
Pulmón	21.847
Melanoma de piel	2.507
Próstata	35.126
Testículo	1.310
Riñón (sin pelvis)	5.109
Vejiga urinaria	18.071
Encéfalo y sistema nervioso	2.263
Tiroides	1.124
Linfoma de Hodgkin	854
Linfomas no hodgkinianos	4.932
Mieloma	1.861
Leucemias	3.575
Otros	9.215
Todos excepto piel no melanoma	160.198

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).



TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	2.555
Esófago	475
Estómago	2.874
Colon y recto	18.187
Colon	12.635
Recto	5.552
Hígado	1.624
Vesícula biliar	1.454
Páncreas	3.954
Laringe	386
Pulmón	7.791
Melanoma de piel	3.672
Mama	32.953
Cérvix Uterino	1.972
Cuerpo Uterino	6.804
Ovario	3.645
Riñón (sin pelvis)	2.191
Vejiga urinaria	4.279
Encéfalo y sistema nervioso	2.152
Tiroides	4.180
Linfoma de Hodgkin	652
Linfomas no hodgkinianos	4.256
Mieloma	1.337
Leucemias	2.667
Otros	7.136
Todos excepto piel no melanoma	117.196

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Figura 5. Incidencia por cáncer de cabeza y cuello en España en función del sexo estimada para el año 2020 según estimación REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer) (Las cifras del cáncer en España 2020)(2).

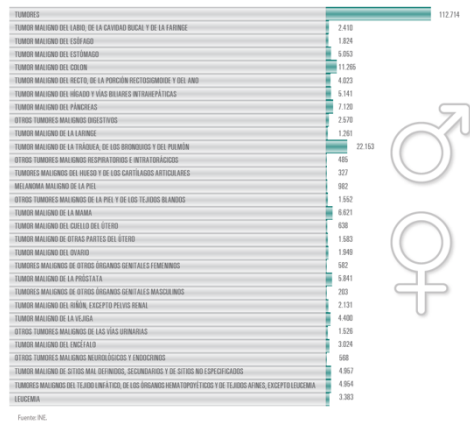


Figura 6. Mortalidad por cáncer de cabeza y cuello en España en función del sexo en el año 2018 según datos proporcionados por el INE (Las cifras del cáncer en España 2020)(2).

El CCC agrupa varias entidades diferentes dependiendo de su sublocalización, tipo histológico y fenotipo biológico. El carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide es la histología presente en más del 90% de los casos, y otras como el carcinoma mucoepidermoide, el adenocarcinoma, el carcinoma adenoide quístico, o el linfoepitelioma constituyen el resto, siendo la última propia del carcinoma de nasofaringe y las tres anteriores propias de los tumores de glándulas salivales. Mientras no se haga referencia explícita en otro sentido, en adelante me referiré al carcinoma epidermoide.

1.3.2. Factores de riesgo

Los factores de riesgo más habituales son la exposición generalmente de manera intensa y prolongada al tabaco y/o alcohol. Mención a parte merecen los cánceres de orofaringe, ya que, debido a los cambios en las prácticas sexuales, en los últimos 20 años ha venido aumentando la incidencia de cánceres de orofaringe ligados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), los cuales se presentan a una edad más temprana, y no suelen asociarse a un consumo tan importante de tabaco o alcohol. Se cree, que dada generalización de la vacunación contra el VPH en las mujeres jóvenes para la prevención del cáncer de cuello de útero, la incidencia en el sexo femenino va a ir disminuyendo con el tiempo, mientras que en los varones, sin embargo, donde la vacunación no está establecida de manera generalizada, se espera que su incidencia aumente de manera significativa en la próxima década fundamentalmente a expensas de la población homosexual (103). La incidencia del cáncer de orofaringe VPH+ es especialmente elevada en USA y en los países del norte de Europa, siendo responsables de entre el 50% y 80% de los cánceres de orofaringe, mientras que en España oscila entre el 20% y 30%. Sin embargo, en USA, se viene observando una ralentización progresiva del incremento de incidencia del cáncer orofaríngeo VPH+ en los adultos jóvenes con edades entre los 45 y 54 años, y se prevé un incremento hasta 2030 de la incidencia en personas nacidas entre 1939 y 1955 a expensas fundamentalmente de varones caucásicos (104). El cáncer de orofaringe VPH+ tiene un pronóstico claramente mejor que el VPH-, pero los datos son aún controvertidos para los cánceres VPH+ de localización extraorofaríngea (105)(106). El mejor pronóstico atribuido al cáncer de

orofaringe VPH+ parece verse reducido cuando coexisten otros factores como el antecedente de tabaquismo importante (> 10 paquetes-año) (105)(107).

Más del 60% de los CCC se diagnostican en una fase localmente avanzada (estadios III, IVA, IVB) presentándose el 30% en fases tempranas (estadios I ó II) y el 10% en fase metastásica (IVC). De los pacientes diagnosticados en fase localmente avanzada, aproximadamente el 50% recaerá en los 3 años siguientes, en su mayoría como una enfermedad ya incurable.

Debido a las estructuras a las que afecta, el CCC es uno de los cánceres que mayor alteración produce de funciones básicas como la ingesta, el habla o la respiración y en consecuencia condiciona enormemente la calidad de vida y la interacción social de los pacientes, requiriendo además de grandes cuidados continuos y tratamientos de soporte (108)(109).

1.3.3. Biología molecular del cáncer de cabeza y cuello

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) se caracteriza por la presencia de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas y cromosómicas, algunas de ellas muy frecuentes pero muchas otras solo presentes en bajos porcentajes, no estando claro el papel patogénico que desempeñan (Véase **Tabla 4**) (110)(111). Las alteraciones más frecuentes afectan al ciclo celular (CDKN2A, TP53, CCND1), a factores de crecimiento (EGFR), a la supervivencia celular (PIK3CA, PTEN), vía de WNT (FAT1, AJUBA, NOTCH1) y a mecanismos de regulación epigenética dependientes de las histonas (KMT2D, NSD1). Parte de estas alteraciones afectan a oncogenes, siendo PIK3CA la vía oncogénica más comúnmente alterada en el CECC, aunque la mayoría afectan a genes supresores o son alteraciones epigenéticas (110). Así como este perfil describe principalmente a los tumores HPV-, en los tumores de orofaringe HPV+ se ha descrito un perfil molecular diferente. Las alteraciones del ciclo celular (CCND1, CDKN2A, TP53, MDM2) son muy frecuentes en los tumores HPV-, siendo claramente menos frecuentes en los HPV+. Las alteraciones en receptores de membrana como EGFR son también más frecuentes en los tumores HPV-. Por otra parte la vía de PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAP kinasas, están más frecuentemente alteradas en los tumores HPV+ mientras que los genes relacionados con la diferenciación celular se alteran más frecuentemente en los tumores HPV- (112). Las alteraciones en la vía de PIK3CA constituyen las alteraciones más frecuentes en el cáncer de orofaringe HPV+. En concreto las mutaciones activadoras y

amplificaciones en PIK3CA, aunque también frecuentes en los tumores HPV-, son más frecuentes en los HPV+. Sin embargo, precisamente por lo frecuentes que son las alteraciones en PIK3CA en el CECC en general, no está claro si su mayor frecuencia está realmente ligada a la infección por el HPV (110)(113).

El CECC es uno de los 10 tumores sólidos con mayor carga mutacional (Tumor Mutational Burden o TMB), lo que explica su elevada antigenicidad y, sin duda debido a esto, el que se trate de uno de los cánceres con una infiltración inmunitaria más importante, justificando la actividad demostrada de los inhibidores de checkpoint inmunológicos en estos pacientes (114)(115)(116).

El carcinoma de nasofaringe (CN), se divide en 3 grupos según la clasificación de la OMS: carcinoma escamoso queratinizante (grupo 1), carcinoma escamoso no queratinizante (grupo 2) y carcinoma indiferenciado o linfopitelioma (grupo 3). Histológicamente, no obstante, algunos autores lo subdividen en carcinoma escamoso, adenocarcinoma y carcinomas pobremente diferenciados e indiferenciados, siendo estos dos últimos los más frecuentes al deberse en su mayoría a la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB). La biología molecular del CN ha sido principalmente estudiada en aquellos tumores ligados al VEB. Se han descrito alteraciones relacionadas con el ciclo celular y genes supresores (CDKN2A, CDKN2B, CCND1, TP53), con la regulación epigenética (MLL2, MLL3, IDH2, TSHZ3, ARID1A, TET1, TET2), con la vía de las MAP kinasas (PIK3CA, FGFR2, KRAS, NRAS), con la adhesión celular (FAT1, FAT2, IGFN1), con la diferenciación celular (NOTCH1, NOTCH3, SYNE1) y con la autofagia (ATG7, ATG13) (117)(118).

Por otra parte, existen otras entidades dentro del CCC que se caracterizan por la sobreexpresión del receptor androgénico como los tumores de ducto salivar (CDS), por la sobreexpresión de Her2, que se observa en 1/3 de los carcinomas mucoepidermoides de glándulas salivares y también en alrededor de otro 1/3 de los CDS (119). Los mamary-analog secretory carcinomas (MASC) se caracterizan por la fusión ETV6-NTRK3 y responden a los inhibidores de NTRK como entrectinib o larotrectinib (120). Por último, entre el 0.5% y 2 % de los portadores de mutaciones en BRCA y otros genes de la familia FANC, desarrollan CECC, pudiendo, en teoría, beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la PARP como olaparib, si bien no existe evidencia clínica de su eficacia en estos casos por el momento (121).

Tabla 4. Alteraciones moleculares más frecuentes en el cáncer de cabeza y cuello (CCC) y tratamientos biológicos con actividad demostrada.

Entidad		Tipo de alteración (%)	Tratamientos biológicos
Carcinoma Epidermoide VPH- (113)		TP53 (84%), CDKN2A (58%), PIK3CA (34%), MYC (14%), EGFR (15%), FGFR1 (10%), ERBB2 (5%), HRAS (5%), IGF1R (4%), EPHA2 (4%)	Cetuximab, anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab) Buparlisib (PIK3CA), Alpelisib (PIK3CA), Tipifarnib (HRAS)
Carcinoma Epidermoide VPH+ (113)		PIK3CA (56%), FGFR3 (11%), DDR2 (3%), EGFR (6%), PTEN (6%), PIK3R1 (3%), TP53 (3%)	Cetuximab, anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab), Buparlisib (PIK3CA), Alpelisib (PIK3CA)
Carcinoma Nasofaríngeo (117)(118)	Epidermoide	CDKN2A (27%), PIK3CA (23%), FBXW7 (11%), PTEN (11%), EGFR (8%)	-
	Adenocarcinoma	and CDKN2A (20%), KRAS (15%), CCND1 (10%), MAP3K1 (10%), NOTCH1 (10%)	-
	Subtipos PD e ID	CDKN2A (29%), IDH2 (16%), SMARCB1 (7%), PIK3CA (6%), NF1 (5%)	anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab, camrelizumab)
Otras entidades (119)(120)	Carcinoma Ductal Salivar	Sobreexpresión RA (96%), Amplificación Her2 (33%)	Bloqueo androgénico, trastuzumab, TDM-1
	Carcinoma Mucoepidermoide	Amplificación Her2 (33%)	Trastuzumab, TDM-1
	MASC	Fusión ETV6-NTRK3	Entrectinib, larotrectinib

ID: indiferenciado, MASC: mamary-analog secretory carcinoma, PD: pobremente diferenciado, VPH: virus del papiloma humano, (-): no disponible.

1.3.4. Enfermedad localizada y localmente avanzada

1.3.4.1. CCC resecable

El tratamiento depende de la localización, de tal manera que en los tumores de cavidad oral o de glándula salivar la cirugía es el tratamiento de elección. Aunque en los tumores en estadios precoces de cavidad oral (estadios cT1-2 N0) la tendencia era a no realizar el vaciamiento ganglionar electivo (VGE), un estudio realizado en la India (donde existe una elevada incidencia de cáncer de lengua), demostró que el VGE de los niveles cervicales I, II y III, se asociaba a una reducción de la mortalidad del 38% a los 3 años (122). Aunque no queda claro si es un contexto plenamente extrapolable al occidental, el VGE debería realizarse al menos en los cánceres de lengua y especialmente si existen factores histológicos de mal pronóstico (pobremente diferenciado, invasión linfovascular o perineural, borde afecto no ampliable).

Tras la cirugía, en los casos con criterios histológicos de alto riesgo (fundamentalmente borde afecto ó metástasis ganglionares con extensión extranodal (EEN), aunque en ocasiones también se tienen en cuenta otros factores como el número de ganglios afectados, y la invasión linfovascular o perineural) y en los tumores localmente avanzados (pT3-T4 y/ó pN+) está indicado el tratamiento adyuvante con radioterapia (RT) con o sin quimioterapia (QT) concurrente (generalmente la QT concurrente con la RT se reserva para aquellos casos con borde afecto (< 5 mm), ≥ 2 gánglios afectados o gánglios con EEN). En un estudio en fase III, se incluyó a 459 pacientes con CECC resecado, que tenían alguna de estas características de alto riesgo (EEN+ y/o margen de resección a < 5 mm). Se ha demostrado que existe un beneficio en SLE del tratamiento adyuvante con QT-RT en pacientes con CCC resecado con factores de alto riesgo y buen estado general y el radiosensibilizante de elección es el cisplatino a dosis altas (123). Por otra parte, se debe individualizar el añadir tratamientos radiosensibilizantes en aquellos pacientes con variables de riesgo intermedio aunque algunos estudios retrospectivos han demostrado un beneficio en supervivencia particularmente en pacientes con ≥ 2 ganglios afectados (124).

Para pacientes no candidatos a cisplatino trisemanal (> 70 años, comorbilidades cardiovasculares, insuficiencia renal, neuropatía periférica, o pluripatología grave), oras opciones son el carboplatino, el cisplatino semanal, o el agente anti-EGFR cetuximab (aunque no existen estudios con cetuximab y RT en adyuvancia, dada su buena tolerancia es frecuentemente utilizado en este contexto) (123)(124)(125)(126).

1.3.4.2. CCC irresecable o candidato a preservación de órgano

Los CCC irresecables, o que afectan a estructuras con alta morbilidad quirúrgica (laringe (glotis, subglotis), hipofaringe y algunos cánceres de lengua y orofaringe) o aquellas entidades con una elevada quimio- y radiosensibilidad (cáncer de nasofaringe) se manejan con estrategias de preservación de órgano, esto es, obviando la cirugía y sustituyéndola por un tratamiento radical con QT-RT, precedidos o no de un tratamiento citorredutor con QT de inducción (QTi) (108)(109). Los tumores en estadio III donde se pretende una estrategia de preservación de órgano, se pueden manejar con QT-RT exclusivamente, sin administrar previamente QTi, siendo, en esta situación el cisplatino trisemanal (100 mg/m² cada 21 días) el radiosensibilizante de elección (127)(128).

Existe controversia respecto al beneficio real producido por la QT_i en el CCC, ya que gran parte de los estudios no han conseguido demostrar una mejora en la supervivencia de los pacientes. No está claro si estos resultados se deben a una ausencia de beneficio real, al hecho de incluir poblaciones heterogéneas, o a las diferencias de diseño entre unos estudios y otros, que abarcan desde el tipo de QT_i utilizada y el tipo de tratamiento concomitante, hasta las técnicas y dosis de RT empleadas, dificultando las comparaciones entre los mismos (108)(109)(129)(130)(131)(132)(133)(134).

Los estudios TAX-323 y TAX-324, publicados en el año 2007, compararon la inducción con 3-4 ciclos de TPF (docetaxel-platino-5FU) o PF (platino-5FU) seguida de RT o QT-RT, respectivamente. La inducción con TPF demostró un beneficio estadísticamente significativo en supervivencia global (SG) frente a la inducción con PF. La QT_i con TPF se asoció a una incidencia de neutropenia G3/4 de entre el 77% y el 83% y de neutropenia febril de entre el 5.2% y el 12%, lo que justifica la profilaxis con factores estimulantes de colonias (G-CSF, por sus siglas en inglés) (108)(109).

En un estudio en fase II/III italiano, se aleatorizó a 421 pacientes a recibir QT-RT precedida o no de QT_i con 3 ciclos de TPF. A su vez cada brazo de QT-RT fue subdividido en dos, a recibir RT con 2 ciclos de PF o RT con cetuximab. La QT_i seguida de QT-RT demostró un incremento en SLP (30 vs 19 meses) y en SG (54 vs 30 meses) con una SG a 3 años del 58% vs 47% (HR 0.74, IC 95% 0.56 – 0.97). Este beneficio en supervivencia del tratamiento con QT_i parece explicarse por el mejor control locoregional alcanzado (131). El estudio en fase III del grupo español TTCC 2007-01, presentado en el congreso de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) de 2016, aleatorizó a 530 pacientes a recibir 3 ciclos de TPF seguidos de RT con cisplatino trisemanal o con cetuximab. El control LCR a 3 años fue mayor en el brazo de cisplatino (55.6% vs 50%) aunque sin alcanzarse diferencias significativas en la incidencia de metástasis a distancia (14% vs 14%) ni en SG a 3 años (61% vs 54%, HR 1.17) (134). En resumen, el esquema TPF es considerado el esquema estándar de QT_i en pacientes con buen estado general, preferiblemente jóvenes, y en donde sea necesaria una citoreducción rápida debido a la sintomatología acompañante o donde se considere alta la probabilidad de diseminación a distancia. De esta forma, los pacientes con tumores de laringe de gran

tamaño y/o N2-3 parecen los más beneficiados por el tratamiento con QT_i (108)(109)(135).

Tanto la QT-RT con cisplatino a dosis altas como la QT-RT tras la QT_i basada en platino, se asocian a una elevada toxicidad acumulativa por platino, por lo que el empleo de otros radiosensibilizantes es deseable en pacientes frágiles o pretratados con platino. En un estudio en fase III que aleatorizó a 424 pacientes con enfermedad localmente avanzada a recibir RT vs RT + Cetuximab (400 mg/m² (carga), 250 mg/m² (siguientes)) con intención radical, la supervivencia global fue significativamente mayor en el brazo de la combinación (49 vs 29.3 meses, HR 0.74; P=0.03), fundamentalmente a expensas de un mayor control locoregional (LCR) (mediana de duración del control LCR: 24.4 vs 14.9 meses, HR 0.68; P=0.005). La combinación fue bien tolerada, si bien la incidencia de rash acneiforme y reacciones infusionales fueron mayores en el brazo de cetuximab. No hubo diferencias entre la incidencia y severidad de la mucositis y radiodermatitis (136).

A día de hoy es cuestionable el empleo de cisplatino trisemanal como radiosensibilizante tras una inducción basada en platino debido a su toxicidad. La excepción serían pacientes muy seleccionados con buen estado de salud y donde se juzgue un beneficio especialmente importante de este tratamiento. De hecho las guías de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomiendan valorar el tratamiento radiosensibilizante con cetuximab tras una inducción con PF o TPF en el CECC no-nasofaríngeo ni de glándulas salivares o senos paranasales (135).

- ***Cáncer de orofaringe VPH+***

En el congreso de ESMO 2018, se presentaron los resultados de un estudio en fase III, que comparó el tratamiento de RT radical con cetuximab o con cisplatino trisemanal (100 mg/m² días 1, 22 y 43) en 334 pacientes con cáncer de orofaringe localmente avanzado VPH+ de bajo riesgo. El tratamiento con cisplatino se asoció a un menor riesgo de recaída a 2 años (6.0% vs 16.1%, HR 4.99, P=0.001) y a una mayor supervivencia global a 2 años (97.5% vs 89.4%, HR 4.99, P=0.001). No hubo diferencias en la mediana de eventos adversos globales entre ambos grupos, si bien hubo más eventos adversos severos en el brazo de cisplatino que en el de cetuximab (137). Simultáneamente, en el congreso de ASTRO 2018, se presentaron los resultados de un estudio en fase III llevado a cabo en 849 pacientes con un diseño similar en pacientes con cáncer de orofaringe

localmente avanzado VPH+ de bajo riesgo e intermedio, demostrando un resultado similar con una supervivencia a 5 años del 85% en el brazo de cisplatino-RT frente al 78% del brazo de cetuximab-RT (138). En resumen, el ECOG, las comorbilidades y el estatus de HPV y otros factores de riesgo deberían tenerse en cuenta a la hora de decidir el mejor tratamiento radiosensibilizante en el contexto localmente avanzado. En pacientes no aptos (*unfit*) para cisplatino, particularmente con tumores HPV negativos, el tratamiento radiosensibilizante con cetuximab continua siendo el de elección en el contexto que nos ocupa.

- ***Vaciamiento ganglionar cervical***

Desde hace algunos años vaciamiento del cuello tras la QT-RT radical (enfermedad no resecada) tiende a ser terapéutico y no electivo, es decir no se realiza salvo en el caso de que se detecte durante el seguimiento la recidiva o persistencia de enfermedad. El estudio PET/NECK, publicado en 2015, demostró que el PET/TC realizado a las 12 semanas de finalizar la QT-RT, era útil y coste-efectivo en la correcta identificación de los pacientes a quienes se debía realizar un vaciamiento terapéutico, permitiendo de esta manera evitar la morbilidad y costes del vaciamiento electivo (139).

1.3.4.3. Técnica y dosis de radioterapia

La técnica de RT recomendada en CCC emplea la RT de intensidad modulada (IMRT por sus siglas en inglés) con Boost Simultáneo Integrado (SIB, por sus siglas en inglés) y el tipo de fraccionamiento dependerá de si la intención del tratamiento es adyuvante o radical. En el contexto adyuvante el fraccionamiento habitualmente recomendado es la administración sobre el PTV1 de una dosis total de 52.8 Gy en 33 fracciones 5 días por semana a 1.66 Gy por fracción. Sobre el PTV2 se administran en total 66 Gy (2Gy/fracción en 33 sesiones). En las áreas de enfermedad macroscópica residual se debe administrar un boost hasta alcanzar una dosis total de 70 Gy (135).

Cuando la intención del tratamiento es radical (enfermedad no resecada) el tumor primario y los ganglios linfáticos afectados reciben entre 66 y 70 Gy (entre 2.2 y 2Gy por fracción, respectivamente). Las áreas de bajo riesgo recibirán entre 44 y 63 Gy (entre 2 Gy y 1.6-1.8 Gy por fracción, respectivamente) (135).

1.3.4.4. Papel de la inmunoterapia en la enfermedad no avanzada

Por último, dada la eficacia y buen perfil de toxicidad de la inmunoterapia en el CCC, y la potencial sinergia con la QT y la RT, varios estudios están testando la combinación de agentes anti-PD(L)1 con QT-RT en la enfermedad localmente avanzada (NCT03040999, NCT02952586, NCT02999087) (140).

1.3.4.5. Cáncer de nasofaringe y otras entidades

En el carcinoma de nasofaringe, el tratamiento consiste en RT sola en los estadios I, y en RT con cisplatino a dosis altas (100 mg/m² cada 21 días) durante 7 semanas en los estadios II, III y IVA. En los estadios II se debe individualizar la necesidad de un tratamiento de inducción o adyuvante con 3 ciclos adicionales de QT basada en platino (generalmente cisplatino-5FU). En los estadios III y IVA se recomienda administrar los 6 ciclos de quimioterapia basada en platino (3 ciclos concomitantes con RT y otros 3 como inducción ó adyuvancia), individualizando la intensidad de dosis y el número total de ciclos en función de la tolerancia de cada paciente (141).

En otras entidades como los tumores de glándulas salivares o tumores de senos paranasales, el tratamiento de elección es siempre la cirugía, continuando luego con el tratamiento adyuvante con RT y/o QT-RT según los criterios expuestos anteriormente para el carcinoma escamoso (119)(142)(143).

1.3.4.6. Enfermedad recurrente o metastásica

La mayoría de los pacientes no serán candidatos a tratamientos locales, debido a irsecabilidad y ha haber recibido RT para la enfermedad localmente avanzada. Por tanto, la opción más empleada en el contexto recurrente o metastásico son los tratamientos sistémicos con intención paliativa (114)(144)(145)(146)(147)(148).

Debido a la aparición de nuevos tratamientos con inhibidores de checkpoint, como nivolumab y pembrolizumab, el tratamiento en la 1ª línea del CCC, dependerá del ECOG del paciente, de la edad y comorbilidades, de los tratamientos de quimioterapia recibidos previamente, de la carga de enfermedad y su velocidad de crecimiento y también del estatus de PD-L1 medido en célula tumoral exclusivamente (TPS) o en células tumorales y células inmunitarias mononucleares, también conocido como “Combined Positive Score” (CPS). En el contexto platino-sensible, el estudio Keynote-

048 comparó la eficacia de pembrolizumab en monoterapia o combinado con PF (platino-5FU) frente al esquema EXTREME, en la población global y en 2 poblaciones definidas por el valor de CPS: $\text{CPS} \geq 20$, $\text{CPS} \geq 1$. Pembrolizumab incrementó la SG frente a EXTREME en $\text{CPS} \geq 20$ (14.8 vs 10.7 M, HR 0.58, IC95% 0.44-0.78) y en $\text{CPS} \geq 1$ (12.3 vs 10.3 m, HR 0.74, IC95% 0.61-0.90) no consiguiendo demostrar la superioridad en la población global (HR 0.83, IC95% 0.7 – 0.99, $p=0.0199$). Pembrolizumab + PF demostró incrementar la SG frente a EXTREME en $\text{CPS} \geq 20$ (14.7 vs 11.0 m, HR 0.6, IC95% 0.45 – 0.82) y en $\text{CPS} \geq 1$ (13.6 vs 10.4 m, HR 0.65, IC95% 0.53 – 0.80). No obstante, tras revisar los datos de SG de la población con CPS 1-19, comunicados en la ficha técnica del fármaco para la FDA y para la EMA, se advierte cierto efecto arrastre en cuanto a la ganancia en SG en la población global y en la población con $\text{CPS} \geq 1$, producidos por el 45% de pacientes que tenían un $\text{CPS} \geq 20$, que son los más beneficiados por la inmunoterapia. La tasa de respuestas fue inferior en el brazo de pembrolizumab en monoterapia frente al de QT, alcanzando un 23% vs 35% en la población con $\text{CPS} \geq 20$, si bien hay que resaltar que la mediana de duración de la respuesta fue muy superior en el brazo de pembrolizumab (22.6 vs 4.5 m). La toxicidad de pembrolizumab fue manejable, similar a la de otros estudios con anti-PD1 en monoterapia y claramente inferior a la de la QT en cuanto a eventos adversos de cualquier grado y eventos adversos graves (grados 3-5). En cuanto a la tasa de respuestas esta fue parecida entre pembrolizumab + PF y EXTREME con un perfil de toxicidad manejable y bastante parecido en los dos brazos, con la salvedad de que hubo más efectos inmuno-relacionados en el brazo de pembrolizumab y más rash acneiforme en el brazo de EXTREME (147)(149).

En ASCO 2019 se presentaron los resultados del estudio TPExtreme, que comparó en N=539 pacientes, 6 ciclos del esquema EXTREME frente a 4 ciclos de la combinación de docetaxel-platino-cetuximab (TPEx). Aunque el estudio no alcanzó su objetivo principal (superioridad de TPEx en SG) debido al buen comportamiento del brazo control, el tratamiento con TPEx alcanzó una SG de 14.5 m (frente a 13.4 m del brazo de Extreme), con una tasa de respuestas del 46% (vs 40% con Extreme), y una toxicidad manejable. Aunque es necesaria la profilaxis con G-CSF debido a la elevada incidencia de neutropenia, la toxicidad de TPEx fue manejable y al prescindir del 5FU en infusión

continúa no necesita de una vía central, con lo que se trata de un esquema más cómodo (144)(148). El tratamiento con TPEx probablemente se convierta en la mejor opción de 1ª línea para pacientes con buen estado general, capaces de tolerar la quimioterapia a altas dosis y donde la expresión de PD-L1 sea baja ($\text{CPS} < 1$). En paciente con estas características pero no candidatos a QT a altas dosis, el tratamiento con paclitaxel-cetuximab semanal (ERBITAX) es probablemente la mejor opción, habiendo demostrado una mediana de SG de 8.1 meses, con una elevada tasa de respuestas objetivas y un muy buen perfil de toxicidad (145).

Se habla de enfermedad platino-refractaria cuando se produce la recaída en los 6 primeros meses después de un tratamiento con platino para la enfermedad no avanzada o tras la progresión a una línea con platino en la enfermedad avanzada. En este escenario, nivolumab es el tratamiento de elección, independientemente del estatus de PD-L1, en base a los resultados del estudio en fase III Checkmate-141. En este estudio se comparó nivolumab frente a 3 opciones de QT de 2ª línea a elegir por el investigador (docetaxel semanal, metotrexate semanal y cetuximab). El estudio demostró que nivolumab incrementaba la SG (7.5 vs 5.1 ms, HR 0.77), alcanzando una tasa de respuestas del 13%, con un mejor perfil de toxicidad y tolerabilidad que la QT (13% vs 36% de toxicidades G3-4). Debido al fenómeno de “plateau” observado con la inmunoterapia en varios tipos de cáncer, un 36% y un 19% -frente a un 19% y un 6% del brazo de QT) de los pacientes tratados con nivolumab continuaban vivos a los 12 y 24 meses, respectivamente. Además, se incluyó a 78 pacientes con enfermedad platino-refractaria por haber recaído en los 6 meses siguientes a un tratamiento basado en platino para la enfermedad no avanzada, siendo 52 en el brazo de nivolumab y 26 en el de QT, alcanzando una supervivencia a 12 meses del 39.2% vs 15.4% y una HR=0.56 a favor de nivolumab (114). Otro anti-PD1, pembrolizumab, ha sido también aprobado por la FDA, la EMA y la AEMPs en el mismo escenario, tras demostrar, en el estudio Keynote-040, de diseño similar al Checkmate-141, incrementar la supervivencia frente a QT en aproximadamente 2.5 meses, con un mejor perfil de toxicidad (EAS G3/G4 13% vs 36%). Al no alcanzar el objetivo estadísticamente pre-especificado, la agencia europea (EMA) sólo ha aprobado pembrolizumab en tumores con una expresión de $\text{PDL1} \geq 50\%$, ya que fue el único subgrupo claramente beneficiado (146). Por último, en caso de un necesitarse una respuesta rápida o tras la progresión al tratamiento con anti-

PD1, el esquema más empleado en nuestro medio en el contexto platino refractario es la combinación de paclitaxel semanal con cetuximab (ERBITAX) (145).

En cuanto a otras entidades, mencionar que el tratamiento de la enfermedad R/M dependerá de la histología concreta. Así en el cáncer de nasofaringe el tratamiento de elección en 1ª línea es la combinación de cisplatino-gemcitabina cada 21 días, que en un estudio en fase III demostró incrementar la SG frente a cisplatino-5FU (29.1 vs 20.9 m) (150). El tratamiento con inhibidores de checkpoint también ha demostrado resultados prometedores tanto en monoterapia como en combinación con QT y probablemente se convierta en una realidad del manejo de este tumor en un futuro próximo (151)(152).

Los tumores de glándulas salivares, constituyen un grupo de entidades heterogéneo tanto clínica como biológicamente. Las histologías más frecuentes son el adenocarcinoma (62%) y el carcinoma epidermoide (22%). El tratamiento es similar al del carcinoma epidermoide de cavidad oral descrito previamente (cirugía seguida o no de RT +/- QT adyuvante), con la salvedad de que la inmunoterapia no tiene indicación, al haberse excluido a estos pacientes de los ensayos clínicos antes mencionados. Entidades como los CDS se caracterizan por el parecido histológico con el cáncer de mama de tipo apocrino y por la sobreexpresión del RA en cerca del 100% de los casos, se benefician del tratamiento con el bloqueo androgénico demostrado en un estudio en fase II y en varias series de casos (153)(154)(155).

Por último, otras entidades de las glándulas salivales se caracterizan por la sobreexpresión de HER2 o ser portadoras de la translocación ETV6-NTRK3, habiéndose demostrado el beneficio por los tratamiento dirigidos contra Her2 (trastuzumab, pertuzumab ó TDM-1) y por los inhibidores de NTRK, respectivamente (120)(156)(157). Entidades más raras, como los carcinomas neuroendocrinos, se tratan de manera similar a como se tratan cuando se desarrollan en otros órganos, recurriendo a la QT con platino y etopósido en caso de tumores de alto grado (158).

1.4. BIOPSIA LÍQUIDA: CONCEPTOS, MODALIDADES Y TECNOLOGÍAS EMPLEADAS

1.4.1. Concepto y modalidades de biopsia líquida

Al hacer referencia a la “Biopsia Líquida” se contemplan diferentes modalidades, incluyendo las células tumorales circulantes (CTC), el ADN tumoral circulante (ADNtc), el ARN tumoral circulante (ARNtc) -especialmente los microRNA (miRNA)-, y las vesículas extracelulares (VECs). Todos estos elementos son liberados por el cáncer a la sangre y otros fluidos, pudiendo, en teoría, ser detectados mediante diversas tecnologías de alta sensibilidad. Al provenir cada uno de estos elementos de zonas diferentes dentro de un mismo tumor, la información que cada uno aportaría podría ser en algunos casos coincidente y en otros poco concordante pero complementaria (5)(159).

1.4.2. Células tumorales circulantes (CTC)

1.4.2.1. Introducción

La primera evidencia de la existencia de CTC data de 1869, y del año 1874 la propuesta de que estas células podrían alcanzar órganos a distancia del tumor primario y dar lugar a metástasis (160)(161)(162). Ya en la segunda mitad del siglo XX, Paget primero, y luego, Langley y Fidler, desarrollaron la teoría de “la semilla y el suelo” proponiendo que las células tumorales tienen preferencia por metastatizar sólo en determinados órganos, buscando el “suelo” más apropiado para “germinar” (5)(163).

Las CTC son liberadas desde el tumor primario y desde las metástasis siendo su vida media en la circulación sanguínea de entre 1 y 2.5 horas. Son células muy seleccionadas que han conseguido salir de su tejido de origen y sobrevivir en un medio hostil como es el de la circulación sistémica (5)(164). Las CTC son eliminadas mediante su extravasación a otros órganos de depuración, como ocurre con el hígado en el caso de las CTC liberadas por el cáncer colorrectal (165). Tanto las CTC individualmente, como, sobretodo, los agregados de CTC (también conocidos como “clusters”) son capaces de salir de la circulación y producir metástasis y la migración de estas células parece estar mediada por gradientes de quimioquinas (5).

En los últimos 20 años se han desarrollado varias tecnologías para el aislamiento, enumeración y caracterización molecular de las CTC. Estas tecnologías se distinguen por emplear métodos de detección diferentes. Pueden emplear métodos basados en inmunoafinidad (IA), es decir, basados en la expresión de marcadores específicos de membrana, o consistir en métodos de aislamiento por características físico-químicas

como el tamaño, la deformabilidad, la carga eléctrica, o por una combinación de ellos. Además, estos métodos permiten el enriquecimiento positivo (se busca aislar la CTC) o negativo (se busca deplecionar la muestra de células no tumorales (CNT) como los leucocitos) (5).

Se ha demostrado el valor pronóstico de las CTC en la enfermedad avanzada en pacientes con cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de próstata, definiéndose puntos de corte de recuento de CTC específicos para cada entidad (166)(167)(168)(169)(170)(171)(172)(173).

Se han llevado a cabo estudios para probar la capacidad de predecir la recaída y así ayudar a definir la necesidad o no de tratamiento adyuvante. En pacientes con cáncer de colon, mama, y cabeza y cuello, pero también en otras entidades, se ha demostrado el valor pronóstico de la detección de CTC tras el tratamiento con intención curativa (5)(169)(174)(175)(176)(177)(178)(179).

Las CTC también se han estudiado en el contexto de la detección precoz del cáncer, en concreto en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) a modo de Biopsia Líquida o CTC “centinelas”, que funcionarían como marcadores precoces del proceso oncológico (5)(180).

Existe un especial interés en el empleo de las CTC como fuente de información molecular, ya que ofrecen la posibilidad de realizar estudios de proteómica y genómica de toda una célula (ADN y ARN), algo que no permiten otras modalidades de biopsia líquida como el ADNtc, los miARNs o las VECs. Se ha demostrado la viabilidad de estudiar el estatus de los receptores hormonales, y la expresión/amplificación de Her2 y de PD-L1 en CTC de pacientes con cáncer de mama, la expresión de PD-L1 en CTC de pacientes con CCC, el estatus de KRAS y BRAF en CTC de pacientes con CCR, el estatus de BRAF en CTC de melanoma, o incluso variantes de resistencia del receptor androgénico (ARV7) en CTC de pacientes con cáncer de próstata, entre otros (5)(181)(182)(183)(184)(185)(186)(187). Asimismo, se ha podido demostrar la heterogeneidad inter- e intra-paciente de determinadas mutaciones como las de KRAS y PIK3CA en CTC de pacientes con CCR (188)(189).

Por último, las CTC han sido menos empleadas como herramienta de monitorización en tiempo real de la respuesta a los tratamientos. En un análisis de datos agregados de 20 estudios, se incluyó a 1944 pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM),

demostrando que las CTC mejoraban la capacidad pronóstica de la estadificación TNM. De hecho, algunos autores sugieren su incorporación a esta clasificación que pasaría a denominarse TNMB, haciendo la “B” referencia al compartimento de circulación venosa periférica (“Blood” o sangre en inglés) (190)(191)(192).

Varios ensayos clínicos han evaluado o están evaluando el papel del recuento y caracterización molecular de las CTC para decidir el tipo de tratamiento como los estudios Treat CTC METABREAST, CirCe 01, DETECT IV, CABA-V7 en los pacientes con CM, CCR, cáncer de próstata o cáncer de páncreas, entre otros (NCT01710605, NCT01548677, NCT01619111, NCT03050866, NCT02035813, NCT02072616).

Por último, las CTC se consideran el principal productor de metástasis, por lo que el desarrollo de terapias anti-CTC es un campo activo de investigación, como sistemas de aféresis, inducción de la expresión de TRAIL como promotor de la apoptosis, impedir la interacción de las CTC con las plaquetas, o promoción de respuestas antitumorales con células NK a nivel de los ganglios linfáticos (193).

1.4.2.2. Conceptos y Terminología empleados en la detección de CTC

La mayor dificultad para la detección de las CTC es la escasísima cantidad en la que están presentes en la circulación, con aproximadamente 1 CTC por cada 10^9 células sanguíneas en pacientes con cáncer metastásico, lo cual obliga al empleo de tecnología muy sensible y específica para su detección (194). Para que esta tecnología sea reproducible, rápida y pueda analizar un número elevado de muestras requiere de un alto grado de sofisticación (6). Gran parte de los métodos de aislamiento de CTC se basan en la detección de proteínas de membrana de origen epitelial, lo cual permite su empleo en pacientes con carcinomas, pero no en pacientes con cánceres de origen mesenquimal o neural, ni en pacientes con carcinomas caracterizados por una importante transición epitelio-mesénquima (TEM). De ahí que se haya intentado incrementar su eficiencia con anticuerpos de captura frente a otros marcadores de membrana o a través de métodos que no seleccionan las CTC por la expresión de proteínas de membrana sino por características físicas o químicas.

No existe un tipo de tecnología de aislamiento de CTC que sea idónea para todas las situaciones, estando cada una más indicada para unos contextos clínicos que para otros. Una cuestión lejos de resolverse con los estudios de CTC, es la manera de tener una

medida de referencia con la que comparar la eficiencia de cada tecnología. Esto se debe a que existe una gran variabilidad en la metodología de detección de CTC empleada con cada sistema y a que los métodos tradicionalmente empleados para medir la capacidad de detección de cada sistema, los llamados estudios de “spike-in” -consistentes en la dilución en muestras de sangre de controles sanos de un número exacto y conocido de células procedentes de un cultivo celular-, tienden a sobreestimar la capacidad de detección de cada sistema. Por ello, lo ideal es validar el funcionamiento de cada tecnología empleando muestras clínicas.

Para poder comparar los diversos métodos de detección de CTC fue necesario definir términos como *eficiencia de captura*, *pureza*, *enriquecimiento* y *rendimiento*. A continuación, se revisan brevemente la terminología empleada y los métodos de detección de CTCs según los refieren Ferreira y colaboradores (6).

- **Eficiencia de captura:** es la capacidad de capturar las células tumorales (CT) en muestras de “spike-in”. Se puede resumir mediante la siguiente fórmula: $CT \text{ capturadas} / CT \text{ reales diluidas ("spiked")}$.
- **Enriquecimiento:** es la eficiencia de captura, pero en relación al fondo de células no tumorales (CNT) existente en la muestra, principalmente leucocitos. Se puede resumir mediante la siguiente fórmula: $Eficiencia \text{ de captura} \times (Leucocitos \text{ capturados} / Leucocitos \text{ reales})$
- **Pureza:** capacidad de capturar de manera específica las CT dentro de un fondo de CNT, habitualmente leucocitos. Se puede resumir mediante la siguiente fórmula: $CTC \text{ capturadas} / (CTC + Leucocitos \text{ capturados})$
- **Rendimiento:** es la velocidad a la que el equipo de detección puede procesar una muestra. Se suele expresar como volumen o número de células por unidad de tiempo.
- **Eficiencia de recuperación:** es el número de CT que es capaz de recuperar el equipo para su posterior análisis molecular o cultivo, en relación al número de CT detectadas.
- **Viabilidad celular:** es el número CT vivas que es capaz de recuperar el equipo para su posterior análisis molecular o cultivo, en relación al número de CT detectadas.

1.4.2.3. Métodos de detección de CTC

En la **figura 7** se resumen las diferentes tecnologías de enriquecimiento de CTC disponibles a fecha de hoy (6).



Figura 7. Tecnologías de enriquecimiento de CTC. CTC: células tumorales circulantes. QMS: Quadruple magnetic sorter. Figura de elaboración propia. Para más información ver texto principal y referencias (6).

1.4.2.3.1. Métodos de detección de CTC por inmunofinidad

Desde su empleo por primera vez en 1998, los métodos de enriquecimiento de CTC por inmunofinidad (IA) continúan siendo los más empleados y la única modalidad aprobada por la Food & Drug Administration (FDA) estadounidense (6). El *enriquecimiento positivo* por IA emplea anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos expresados en la membrana de las CTC (Ej.: EpCAM) y el *enriquecimiento negativo* lo hace contra antígenos de CNT, habitualmente antígenos leucocitarios (Ej: CD45) para así deplecionar la muestra de células hematopoyéticas. Los métodos de enriquecimiento negativo consiguen una pureza sensiblemente menor que los de enriquecimiento positivo, si bien evitan problemas cuando se emplean anticuerpos difíciles de despegar de las CTC en el momento del recuento (6)(195)(196)(197).

La identificación de una CTC mediante IA, depende del enriquecimiento y de otros factores inmunohistológicos como la expresión de citoqueratina y la tinción nuclear con DAPI, de tal manera que la definición más aceptada de CTC es la de una célula nucleada EpCAM+/CK+/CD45-, si bien no es menos cierto que, a día de hoy no existe una definición que pueda aplicarse de manera universal (6)(198)(199)(200)(201)(202).

1.4.2.3.1.1. Enriquecimiento positivo

La mayoría de estos métodos emplean anticuerpos dirigidos contra antígenos epiteliales de superficie como EpCAM, habiéndose demostrado su utilidad en varios estudios, para el recuento de CTC en pacientes con cáncer de mama, próstata, colon y pulmón. No obstante, debido al fenómeno de TEM referido anteriormente, es frecuente que algunas poblaciones de CTC pierdan la expresión de marcadores epiteliales, y no puedan ser detectadas. Es por ello, que varios equipos de enriquecimiento positivo utilizan también anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del cáncer (EGFR, HER2), mesenquimales (CSV) o de células madre tumorales (CD133) (6)(203)(204)(205)(206)(207).

➤ Métodos inmunomagnéticos de enriquecimiento positivo

CellSearch®

CellSearch® detecta CTC mediante anticuerpos anti-EpCAM identificándolas según la definición de células nucleadas EpCAM+/CK+/CD45-. El sistema CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems) es el único método de detección de CTC aprobado por la FDA para su empleo en pacientes con cáncer de colon, mama y próstata en fase metastásica (6). Se han establecido puntos de corte con capacidad pronóstica con CellSearch en cáncer de mama y próstata (≥ 5 CTC) y en CCR (≥ 3 CTC) en fase avanzada. La validez de CellSearch® como método de detección viene avalada por su utilización en varios estudios prospectivos, ensayos clínicos y meta-análisis, convirtiéndose en lo más parecido al “estándar oro” para la detección de CTC, siendo el método frente al que se comparan el resto de métodos de detección. No obstante, aunque en líneas celulares ofrece tasas de detección de entre el 12% y el 75% para aquellas con baja y alta expresión de EpCAM, respectivamente, el recuento de CTC tiende a ser bajo y a encontrarse por debajo de 5 CTC en la mayoría de entidades estudiadas en el contexto metastásico (193) (Véase **Tabla 5**).

CellSearch® emplea nanopartículas ferrofluidas dotadas de un anticuerpo anti-EpCAM para permitir la separación magnética de las células EpCAM+ del resto de componentes celulares sanguíneos. Tras su captura, las CTC son teñidas para confirmar la expresión de citoqueratinas (CK 8, 18, 19) y DAPI así como la ausencia de expresión de CD45 (Véase **Tabla 5**) (6)(166)(202)(167)(168)(179)(170)(208)(209)(171)(173)(210).

Tabla 5. Estudios más relevantes empleando el sistema CellSearch® en el aislamiento de CTC.

Autor	Sistema de detección de CTC	n (pacientes)	Tasa de detección de CTC	Otros hallazgos
Cristofanilli (2004) (167)	CellSearch®	177 CM IV basal y post-QT	≥ 2 CTC: 108 (61%)	≥ 5 CTC basal: peor SLP y SG ≥ 5 CTC post-QT: peor SLP y SG ≥ 5 CTC basal y < 5 CTC post-QT: mejor SLP y SG que pts en que no hubo reducción de CTC post-QT
Martin (2015) (168)	CellSearch®	99 CM IV basal y post-QT	≥ 1 CTC: 73 (73%)	< 5 CTC (vs ≥ 5 CTC) post-QT mejor SLP y SG
Lucci (2016) (179)	CellSearch®	302 CM I-III pre-Cx y pre-QT adyuvante	≥ 1 CTC: 73 (24%)	≥ 1 CTC: peor SLE y SG
Franken (2016) (202)	CellSearch®	404 CM I-III pre-Cx	≥ 1 CTC: 76 (19%)	≥ 1 CTC: peor SLE y mayor mortalidad por CM
Zhang (2017) (170)	CellSearch®	6000 pacientes con CM de 49 estudios	-	Confirma valor pronóstico de las CTC tanto en fase metastásica como no avanzada
Moreno (2018) (208)	CellSearch®	37 CPRCm	≥ 5 CTC: 23 (62%)	≥ 5 CTC (vs < 5 CTC): peor SG
De Bono (2018) (209)	CellSearch®	231 CPRCm pre-QT	≥ 5 CTC: 125 (57%)	≥ 5 CTC (vs < 5 CTC): peor SG ≥ 5 CTC basal y < 5 CTC post-QT: mejor SLP y SG que pts en que no hubo reducción de CTC post-QT
Scher (2015) (166)	CellSearch® (estudio COU-AA-301)	972 CPRCm tratados con Prednisona +/- AA basal y a las 4, 8 y 12 semanas	≥ 5 CTC: 261 (37%)	≥ 5 CTC basal (vs < 5 CTC): peor SG > nº pts con ≥ 5 CTC basales tratados con AA (vs prednisona solo) mostraron descenso en recuento de CTC a las 12 semanas
Sastre (2012) (171)	CellSearch®	180 CCRm	≥ 3 CTC: 85 (47.2%)	≥ 2 CTC en: estadio II (21%), estadio III (24%), estadio IV (61%). > número de CTC a > estadio.
Cohen (2009) (211)	CellSearch®	413 CCRm basal y post-QT	≥ 3 CTC: 108 (262%)	≥ 3 CTC basal: peor SLP
Tol (2010) (173)	CellSearch® (estudio CAIRO2)	467 CCRm basal y post-QT	≥ 3 CTC: 129 (29%)	≥ 3 CTC basal: peor SLP y SG ≥ 3 CTC basal y post-QT: peor SLP y SG que en pts en los que no disminuyó recuento de CTC
Sastre (2013) (210)	CellSearch® (estudio MACRO)	158 CCRm basal y post-QT	≥ 3 CTC: 76 (49%)	≥ 3 CTC basal: peor SLP y SG ≥ 3 CTC post-QT: peor SLP y SG

CCRm: cáncer colorrectal metastásico, CM: cáncer de mama, CPRCm: cáncer de próstata resistente a la castración metastásico, CS: controles sanos, CTC: células tumorales circulantes, Cx: cirugía, pts: pacientes, QT: quimioterapia, SLE: supervivencia libre de enfermedad, SLP: supervivencia libre de progresión, SG: supervivencia global.

AdnaTest (Adnagen AG)

Funciona de manera parecida a CellSearch®, aunque utiliza varios anticuerpos simultáneamente que varían dependiendo del tipo de cáncer. Además, el AdnaTest lisa

las células para medir por RT-PCR la expresión de diferentes marcadores tumorales, identificando las CTC si la cantidad de al menos uno de los marcadores está por encima de un punto de corte preespecificado (6)(212)(213).

Magnetic Cell Sorter (MACS) y MagSweeper

MACS emplea un campo magnético de alto gradiente para capturar células marcadas con nanopartículas magnéticas conjugadas con anticuerpos para su enriquecimiento positivo (EpCAM) o negativo (CD45). El MagSweeper aspira, mediante un campo magnético, los pocillos que contienen las muestras premezcladas con partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos específicos (6)(214)(215). En resumen, ambos sistemas emplean campos magnéticos potentes en combinación con la selección por IA para aislar las CTC.

➤ Métodos de enriquecimiento positivo con sistemas de microfluído

Matrices de microfijación celular (“Micropost Array”)

Los sistemas de microfluído consiguen un mejor control de la velocidad y la dirección del flujo permitiendo así mayor tiempo para el contacto anticuerpo-antígeno y en definitiva para la captura celular (**Figura 8**). Como desventaja adolecen de un bajo flujo de trabajo, que limita el volumen que pueden procesar pero a su favor tienen que pueden procesar sangre total, sin necesidad de separación previa de sus componentes (6)(216). Ejemplos de sistemas de microfluído parecidos son el CTC-Chip, el GEDI (Geometrically enhanced differential immunocapture), el HB Chip (Herringbone chip), el GO Chip (Graphene oxide chip) y el sistema OncoCEE (Onco Cell Enrichment and Extraction) (Biocept, Inc. San Diego, CA, USA) (6)(193)(217). Son sistemas de alta eficiencia en el enriquecimiento de CTC, pero su mayor limitación es que, debido a la dificultad para despegar las CTC de la matriz de microfijación, no permiten su recuperación para estudios moleculares (193).

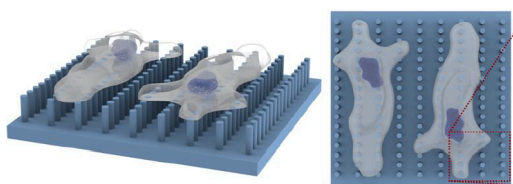


Figura 8. Ejemplo de sistema de microfluído. Modificado de Sochol RD, et al. *Inducing cellular alignment on micropost arrays via biophysical spatial stimuli.*

Sistemas inmunomagnéticos

IsoFlux™

Este sistema, emplea un sistema de flujo continuo con 3 zonas o reservorios distintos (zona de entrada de la muestra, reservorio de desecho y zona de aislamiento/recuperación de CTC) interconectadas por un canal de microfluído que permite el paso de la muestra con tiempo suficiente para el aislamiento o recuperación de las CTC. La muestra se mezcla con partículas inmunomagnéticas con anticuerpos específicos de células de tipo epitelial (anti-EpCAM). Cuando la muestra atraviesa las zonas de aislamiento o de recuperación de CTC, un campo magnético atrae las CTC unidas a las partículas inmunomagnéticas permitiendo así su separación del resto de células de la muestra, que en su inmensa mayoría son células leucocitarias (181). El funcionamiento del sistema IsoFlux™ se describe con más detalle en la sección de *Pacientes y Métodos*.

La evidencia actual sobre la utilidad de este sistema se limita a pequeñas series de pacientes en diversas entidades (178)(182)(181)(218)(219)(220)(221)(222)(223)(224)(225)(226)(227)(228). Un estudio llevado a cabo por el fabricante (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA) demostró una capacidad de recuperación de CTC en estudios de *spike-in* del 74%, 75% y 85%, empleando líneas celulares con baja, intermedia y alta expresión de EpCAM, respectivamente. Al comparar CellSearch® e IsoFlux™ en muestras de *spike-in* con células con expresión de EpCAM intermedia-baja, la capacidad de detección de CTC fue del 40% y 90%, respectivamente. Al comparar estos dos sistemas en muestras de n=22 pacientes con cáncer de próstata, la detección de ≥ 4 CTC fue del 95% y 36% con IsoFlux™ y CellSearch®, respectivamente. En una cohorte de 14 pacientes con CCR en estadios II-IV, el 87% presentó ≥ 4 CTC, límite establecido como el mínimo necesario para poder llevar a cabo estudios mutacionales en CTC. Empleando castPCR™, se detectaron mutaciones de KRAS en ADN de CTC en el 50% de los pacientes (181). Además del estudio referido, el presente trabajo es el único que ha empleado IsoFlux™ en pacientes con CCR y nunca antes ha sido empleado en pacientes con CCC. Los estudios publicados empleando IsoFlux™ se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Estudios más relevantes empleando el sistema IsoFlux™ en el aislamiento de CTC.

Autor	Sistema de detección de CTC	n (pacientes)	Tasa de detección de CTC	Otros hallazgos
Harb (2013) (181)	IsoFlux	15 CCR estadios I-IV	87% (100% ≥ 4 CTC)	47% KRAS ^{MUT} en CTC
Sánchez-Lorencio (2015) (178)	IsoFlux vs CellSearch	21 CHC en espera de trasplante	IsoFlux: 90.5% (0-1326 CTC) CellSearch: 4.7% (0-3 CTC)	-
Ramírez (2016) (229)	IsoFlux	24 CHC en espera de trasplante	Pre-trasplante: 87.5% (21/24) (0-1768 CTC) 1-m post-trasplante: 78.6% (11/14) (0-1150 CTC) 6-m post-trasplante: 87.5% (7/8) (0-214 CTC)	> número de CTC a > tiempo en lista de espera para trasplante
Ma (2016) (182)	IsoFlux	10 CPHS 14 CPRC	CPHS: 100% (8 CTC (3-65)) CPRC: 100% (44 CTC (10-184))	Detección ARV7 en CTC (PCR digital): CPHS: 0% CPRC: 8/14 pacientes
Brychta (2017) (218)	IsoFlux vs método de filtración por tamaño	Líneas celulares de CPan con baja expresión EpCAM	Líneas celulares: 1% (IsoFlux) vs 52% (método experimental)	-
Brungs (2018) (219)	IsoFlux	15 CGE (Cohorte 1) 43 CG3 (Cohorte 2)	Cohorte 1: diferencia numérica en mediana de CTC entre muestras frescas (51.5 CTC) y criopreservadas (34.4 CTC) Cohorte 2: 95.5% (42/43) (17 CTC (8-38)).	Peor pronóstico a > nº CTC
Lee (2018) (220)	IsoFlux vs método de aislamiento por características bioeléctricas	Estudios de spike-in con líneas celulares de CCR	< nº falsos positivos con método experimental que con IsoFlux	-
Vilhav (2018) (221)	IsoFlux	10 CPeriampulares (muestras intraoperatorias pre-resección)	> nº CTC en sangre portal que en arterial (58 vs 24 CTC)	-
Montalbo (2019) (222)	IsoFlux (detección en base a expresión de EpCAM, CDH2 y PSCA)	24 CPRC (muestras pre- y post-taxanos)	Aumento de expresión de genes relacionados con RA y fenotipo TEM y NE	-
Alva (2015) (223)	IsoFlux vs CellSearch	20 CV cohorte neoady 13 CV cohorte met 11 CS	<u>IsoFlux:</u> Cohorte neo: 5 CTC Cohorte met: 29 CTC <u>IsoFlux vs CellSearch:</u> 5 pts neoady con muestras pre- y post-QT: IsoFlux > 10 CTC en 44%; CellSearch > 10 en 0 pacientes.	Mediante NGS mutaciones en CTC en 50% (4/8) de casos en FGFR2, PDGFRA, EGFR, JAK2, KRAS, BRAF y TP53
Ionescu-Zanetti (2014) (224)	IsoFlux	9 CPróstata 5 CRenal	Detección CTC en 100% 245 CTC (14-1606)	Mediante NGS mutaciones en CTC en FGFR2, FBXW7, PTCH1, TP53, APC, CBL, KDR y APC
Po (2019) (225)	IsoFlux	14 Melanoma IV	CTC en 87.5% CTC PDL1+: 38.6%	-
Po (2018) (226)	IsoFlux (detección en base a expresión de EpCAM +/- N-cadherina)	18 COvario	> detección de CTC con anticuerpos anti-EpCAM + anti-N-cadherina vs anti-EpCAM solo	-
Agerbaek (2018) (227)	IsoFlux (detección en base a expresión de rVAR2)	25 CPróstata 9 CPáncreas 4 CHC 6 CPNCP	-Detección de CTC en todos los tipos de cáncer testados -CPróstata: > nº CTC a > estadio tumoral	Detección mutación KRAS en CTC en 4/4 pacientes con CPáncreas
Wynne (2013) (228)	IsoFlux	20 CPNCP 4 CS	Mediana CTC: Estadio I: 28.4 CTC Estadio II-IV: 142.4 CTC CS: 1.7 CTC	> nº CTC a > tamaño tumoral

ARV7: variante 7 del receptor androgénico, CCR: cáncer colorrectal, CGE: cáncer gastroesofágico, CHC: carcinoma hepatocelular, CPan: cáncer de páncreas, CPNCP: cáncer de pulmón no de célula pequeña, CPHS: cáncer de próstata hormonosensible, CPRC: cáncer de próstata resistente a la castración, CR: cáncer renal, CS: controles sanos, CTC: células tumorales circulantes, CV: cáncer de vejiga.

Liquid Biopsy

Se trata de una tecnología parecida a IsoFlux™, al ser un equipo automatizado que emplea un sistema de microfluído y de captura inmunomagnética. Al igual que IsoFlux™ puede utilizar diferentes anticuerpos de captura además de EpCAM (206).

CTC iChip

Se trata de un sistema que emplea un racional múltiple de funcionamiento. Este procesa la muestra de sangre completa y se compone de tres partes: 1) separación hidrodinámica por tamaño de la fracción mononuclear; 2) alineación de células mononucleares en fila mediante un flujo inercial; 3) separación inmunomagnética de las CTC del resto del componente celular no tumoral; 4) circuito de microfluído. Permite utilizar tanto anticuerpos frente a CTC para enriquecimiento positivo (EpCAM), o frente a leucocitos (anti CD-45) para su depleción de la muestra (6)(193)(230)(231).

Ephesia chip

Este sistema combina la captura inmunomagnética empleando micropartículas imantadas, con el diseño de una matriz de microfijación celular de miles de columnas inmersa en un sistema de microfluído (6)(232)(233).

Magnetic sifter

Emplea un sistema de flujo vertical en lugar de horizontal, permitiendo que la muestra atraviese un campo magnético constituido por una matriz con configuración en panel. Permite la recuperación de las CTC para estudios moleculares posteriores (6)(234).

➤ Métodos de enriquecimiento positivo “in vivo”

El sistema GILUPI CellCollector (GILUPI Nanomedizin) utiliza una guía que se coloca por vía intravenosa recubierta de anticuerpos anti-EpCAM que sirven para capturar las CTC permitiendo procesar grandes cantidades de sangre durante unos 30 minutos (6)(235).

- **1.4.2.3.1.2. Métodos de enriquecimiento negativo**

Estos métodos seleccionan las CNT mediante anticuerpos dirigidos contra ellas. El componente de CNT más abundante es el leucocitario, por lo que todos los métodos de inmunoafinidad de este tipo emplean anticuerpos anti-CD45 (6)(230)(231)(214).

EasySep y Quadruple Magnetic Separator (QMS)

El EasySep emplea partículas inmunomagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD45 para separar las células CD45+ mediante un campo magnético. A diferencia del EasySep,

el QMS emplea un citómetro de flujo acoplado a un imán que separa las células unidas a partículas inmunomagnéticas (236)(237).

1.4.2.3.2. Métodos de enriquecimiento por características biofísicas

Estos métodos separan las diferentes poblaciones celulares existentes en la sangre, por características físicas como su densidad, tamaño, deformabilidad y carga eléctrica (6).

- Métodos de detección por tamaño

Los métodos empleados para medir el tamaño celular se basan en la microscopía óptica y en la citometría de flujo. Generalmente, las CTC (12-25 μm) tienen un tamaño mayor que los leucocitos (8-14 μm), por lo que esta diferencia es clave para el funcionamiento de los métodos de detección por tamaño (238)(239).

- Métodos de detección por deformabilidad

Varios estudios han demostrado que las CTC tienen una mayor deformabilidad que las CNT, pudiendo de esta forma conferir una mayor capacidad de invasividad y metástasis. No obstante, la medición de la deformabilidad celular requiere que las células estén vivas, algo que no permiten la mayoría de los métodos de enriquecimiento (240)(241).

- Centrifugación

Constituye uno de los primeros métodos que se desarrollaron para la detección de CTC, ya que la gravedad específica es diferente entre los hematíes, los leucocitos y las CTC, de tal manera, que tras la centrifugación de la muestra, las CTC se quedarían en la parte superior (242). No obstante, al no eliminar la contaminación por células leucocitarias, los sistemas de centrifugación se emplean como una primera fase del enriquecimiento, a ser completada mediante otras técnicas, principalmente de IA. Ejemplos son los métodos FicollPaque, OncoQuick, el sistema RosetteSep CTC Enrichment Cocktail (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) y el sistema AccuCyte (RareCyte) (243)(244)(245).

Un tipo algo diferente dentro de los sistemas de separación por centrifugación es el de los sistemas basados en la generación de flujos secundarios en forma de vórtices. Un ejemplo es el sistema Labyrinth (193).

- Microfiltración en 2 y 3 dimensiones

Los sistemas de microfiltración permiten un procesamiento rápido de la muestra, incluso de sangre total, pero es fácil que se obstruyan y algunos de ellos requieren múltiples filtros y no consiguen evitar la contaminación con células leucocitarias. Para evitar estos inconvenientes, la combinación con otros métodos de aislamiento, como la IA son a menudo empleados.

- Sistemas de microfiltración en 2 dimensiones

Seal, en 1964, diseñó el primer sistema de microfiltración, tras observar que las CTC tenían un tamaño más grande y una consistencia más rígida que el resto de células sanguíneas (246). Desde entonces la tecnología de microfiltración se ha modernizado, con la aparición de láminas de policarbonato con nano- o microporos. Existen dos sistemas comercializados: el ISET (Rarecells Diagnostics) y el ScreenCell (ScreenCell).

ISET significa, por sus siglas en inglés, “Aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales”. Este sistema filtra la muestra a través de una membrana de policarbonato con poros de 8 μm . Debido a su baja porosidad, a veces se obstruyen por células sanguíneas, lo cual constituye su mayor desventaja (180)(193)(247)(248). El sistema ScreenCell, parecido al ISET, emplea filtros grabados con una superficie hidrofílica con poros de entre 7.5 y 6.5 μm (249). Otros ejemplos son el sistema de microfiltros CellSieve (Creatv MicroTech) y el FMSA (Flexible Micro Spring Array) (250). Las principales limitaciones de estos sistemas de filtración basados en tamaño, son la baja recuperación y pureza obtenidas así como el bajo volumen de muestra procesable en comparación con los métodos de IA (193).

- Sistemas de microfiltración en 3 dimensiones

La microfiltración en 3 dimensiones parte del mismo principio que la de 2 dimensiones, pero la membrana de microfiltración tiene un diseño tridimensional y por ello son más complejas. El FaCTChecker (Circulogix), el sistema Parsortix (ANGLE) y el sistema Cluster-Chip -este último permite el aislamiento de “clusters” de CTC- son ejemplos de este tipo de sistemas de microfiltración tridimensional (251)(252)(253).

- Sistemas de aislamiento por inercia

Estos sistemas emplean fuerzas inerciales para separar CTC del resto de componentes celulares de la sangre, de tal manera que retienen a las CTC que en principio son más grandes y pesadas que los leucocitos (254). Ejercen un mínimo daño sobre las células capturadas y permiten incluso la recuperación de células vivas. Ejemplos son los sistemas Vortex Chip, ClearCell FX (Clearbridge Biomedics) y el “Parallel multiorifice flow fractionation” (p-MOFF) (193)(239)(255).

- Dielectroforesis

La dielectroforesis (DEP) aprovecha las diferentes características eléctricas de las células, que dependen de su composición (membrana celular, núcleo, organelas), morfología (tamaño, forma) y su fenotipo. Así se puede aplicar la DEP con dos objetivos: la migración celular o su retención. El sistema ApoStream (ApoCell) utiliza la DEP de campo y flujo fraccionados y atrae a las CTC mediante un campo positivo y repele a los leucocitos mediante un campo negativo (193)(256). El sistema DEPArray (Menarini Silicon Biosystems) retiene a las CTC en pocillos mediante DEP con una matriz de electrodos. A diferencia de la mayoría de sistemas de aislamiento de CTC, está diseñado para el aislamiento de célula única, y permitir así su caracterización molecular, tras su enriquecimiento previo mediante otros sistemas (Ej. CellSearch®). Sin embargo, el sistema DEPArray tiene el inconveniente que se pierde aproximadamente el 40% de las CTC durante el procesamiento de la muestra, con lo cual sólo parece aplicable a muestras con alto número de CTC (257)(258)(259).

1.4.2.3.3. Modalidades de imagen directa

Todos los métodos de detección de CTC descritos en los apartados anteriores necesitan de un método adicional para poder identificar visualmente las CTC, proceso que, para algunos de ellos, está parcialmente automatizado junto con el proceso previo de enriquecimiento (Ej. CellSearch®). Sin embargo, existen otros sistemas de detección que no requieren del enriquecimiento previo de la muestra y permiten la detección y visualización directas de las CTC. Ejemplos de estos métodos son el FASTcell (SRI International), el CytoTrack, la microscopía confocal, y el SERS (“Surface-enhanced Raman

Scattering”) (260)(261)(262)(263). Por último, la citometría de flujo fotoacústica (PAFC, por sus siglas en inglés) permite la detección de CTC en tiempo real al aplicar un laser al flujo venoso a través de la piel. El aumento de temperatura de las CTC emite ondas acústicas que pueden detectarse mediante un receptor de ultrasonidos (264).

1.4.2.3.4. Estudios funcionales en CTC

Permiten detectar las CTC en base a la producción por estas células de proteínas específicas (EPISPOT) o de la capacidad de adhesión preferente de las CTC a una matriz especial (Vita-Assay, Vitatex) (5)(6)(265) .

1.4.3. ADN TUMORAL CIRCULANTE (ADNtc)

1.4.3.1. Generalidades

El ADNtc son fragmentos de ADN tumoral liberado desde células tumorales en proceso de apoptosis o de necrosis procedentes tanto del tumor primario como de metástasis o incluso de las CTC. El ADN libre circulante (ADNlc) no procede únicamente de las células malignas sino que los tejidos sanos con células en fase de recambio también liberan a la circulación parte del ADNlc. Es difícil distinguir entre el ADNlc originado de tejido tumoral o de tejido sano, más allá, de la detección de mutaciones características del tejido malignizado, aunque algunos estudios sugieren que la longitud de los fragmentos de ADNlc podría orientar hacia el origen tumoral o no de este ADNlc (266)(267). La vida media del ADNlc es de alrededor de 15 minutos, y se elimina principalmente por vía hepática y renal, de tal manera que su insuficiencia incrementa los niveles de ADNlc en la sangre (266)(268).

Se han desarrollado varios métodos para la detección de ADNtc en el plasma y otros fluidos, como la PCR digital, la tecnología BEAMing, o la secuenciación masiva de nueva generación (Safe-Seq), todos basados en la detección, con alta sensibilidad, de mutaciones específicas del tejido tumoral. Esto es importante ya que la cantidad de ADNtc en cualquier fluido del organismo suele ser muy baja en comparación con la del ADN de origen no tumoral (5). No solo la sensibilidad, sino la especificidad, pueden afectar a la capacidad de detección, ya que mutaciones asociadas al cáncer se pueden detectar también en controles sanos que nunca desarrollarán tumores sólidos. Además, la hematopoyesis clonal, consistente en la detección en el plasma de mutaciones

somáticas procedentes de clonas de células mieloides, se observa en el 10% de los mayores de 65 años (269).

Varios estudios han demostrado que la probabilidad de detección del ADNtc aumenta con el estadio de la enfermedad y con la carga o volumen tumoral (270)(271). Por ello, hasta la fecha, el ADNtc ha demostrado mayor utilidad en la monitorización de la respuesta a los tratamientos en pacientes con cánceres en fase avanzada o metastásica (190). El ADNtc permite la identificación y monitorización de alteraciones que definen a entidades concretas, como, por ejemplo, la detección de mutaciones de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón, la detección de la amplificación y mutación del receptor androgénico (RA) en pacientes con cáncer de próstata, o la emergencia de las mutaciones en RAS en pacientes con CCRm durante el tratamiento con anti-EGFR (272)(273)(274)(275)(276)(277)(278).

Por último, otra posible aplicación del ADNtc es la de la detección precoz del cáncer.

En un estudio llevado a cabo en 1005 pacientes con cánceres de ovario, hígado, estómago, páncreas, esófago, colorrecto, pulmón y mama en estadios resecables (I, II, y III) y en una cohorte de 812 controles sanos se analizó el empleo combinado del ADNtc y de 8 marcadores proteicos previamente descritos como biomarcadores en algunos de estos cánceres, denominando al método de detección CancerSEEK. Se empleó la secuenciación masiva de 61 amplicones -de 33 pares de bases cada uno- distribuidos en 16 genes diferentes. La tasa de detección fue del 70% con una sensibilidad del 69-98% y una especificidad del 99% para 5 tipos de cáncer para los que no existen métodos de detección precoz disponibles a día de hoy en la población general. Además, mediante inteligencia artificial, se pudo predecir la localización del cáncer en el 83% de los casos. Sin embargo, CancerSEEK resultó positivo en < 50% de los pacientes en estadio I y en < 80% de aquellos en estadios II o III, por lo que la sensibilidad continua siendo una limitación importante de cara al establecimiento del ADNtc como método de detección precoz (271).

Liu y colaboradores (279), en otro trabajo llevado a cabo en 4207 controles sanos y en 2482 pacientes con más de 50 tipos diferentes de cáncer, estudiaron mediante un panel de secuenciación por bisulfitos más de 100.0000 regiones metiladas de interés. El objetivo, al igual que en el trabajo anterior, fue la detección precoz y la localización del origen del cáncer. En el grupo de los 12 cánceres con mayor mortalidad conjunta en

USA, la sensibilidad en estadios I-III fue del 67.3%, y del 43.9% en el conjunto de todos los cánceres incluidos. En el grupo de los 12 cánceres la detección aumentó con el estadio tumoral (I: 39%, II: 69%, III:83% y IV: 92%) al igual que en el global de cánceres incluidos (I:18%, II:43%, III:81%, IV: 93%). La especificidad en la identificación del tejido de origen fue del 93%. Por tanto, el empleo del análisis de metilación en ADNtc podría resultar una herramienta muy útil en el diagnóstico temprano y localización primaria del cáncer.

1.4.3.2. Tecnologías de detección de ADNtc

Los métodos para la detección del ADN tumoral circulante (ADNtc) en el plasma y otros fluidos biológicos, requieren de una elevada sensibilidad y especificidad para poder detectar cantidades ínfimas de ADN fragmentado de origen tumoral. Los métodos de detección de ADNtc se basan en la detección de mutaciones del tejido tumoral, bajo el principio de que estas son específicas del mismo y por tanto inexistentes en el tejido sano. Dado que se precisa de métodos de muy alta sensibilidad, aquellos habitualmente empleados para el análisis mutacional en tejido como la secuenciación Sanger o las técnicas de PCR en tiempo real (RT-PCR) habituales, no son válidas para el estudio del ADNtc. Véase **Tabla 7**.

1.4.3.2.1. PCR digital

A modo de ejemplo, el equipo QuantStudio 3D Digital PCR system (Life Technologies, ThermoFisher) tiene una sensibilidad de entre el 0.01% y el 0.1% para la detección de mutaciones en puntos calientes o “hot-spots” del ADN donde se concentran mutaciones frecuentes como la de KRAS en CCR o la de BRAF en el melanoma.

1.4.3.2.2. Allelic Refractory Mutation System (ARMS)

La tecnología ARMS emplea cebadores de PCR específicos de secuencia que permiten la amplificación del ADN de prueba solo cuando el alelo objetivo está contenido dentro de la muestra. Esta tecnología permite detectar alelos mutados en frecuencia muy baja, de hasta el 1% (1 alelo mutado entre 99 no mutados) (280).

1.4.3.2.3. Competitive allele-specific TaqMan PCR (castPCR)

La tecnología castPCR™ permite el análisis mutacional combinando una PCR cuantitativa alelo-específica con oligonucleótidos bloqueadores específicos que

suprimen la amplificación no específica de alelos que no sean el que se quiere amplificar. Su sensibilidad es de 0.1%-0.5% (281)(282).

1.4.3.2.4. *Beads, Emulsion, Amplification and Magnetism (BEAMing)*

Al igual que la PCR digital, la tecnología BEAMing permite identificar mutaciones específicas y frecuentes en puntos calientes o “hot spots” de interés. Se basa en la emulsificación del producto de la PCR, permitiendo detectar 1 alelo mutado entre 10.000 alelos no mutados, implicando, en la práctica una sensibilidad de entre 0.01% y el 0.04%. Varios estudios han demostrado una elevada concordancia del estatus mutacional de RAS y PIK3CA entre el tumor primario y el plasma en pacientes con CCR y con CM, respectivamente (283)(284). A día de hoy la tecnología BEAMing constituye la tecnología más sensible para la detección de mutaciones específicas en ADNtc.

1.4.3.2.5. *Secuenciación Masiva (NGS)*

La secuenciación masiva (Next generation sequencing o NGS) es utilizada por, entre otras, la marca Illumina® que emplea una técnica conocida como "amplificación en puente" en donde las moléculas de ADN (de aproximadamente 500 pares de bases) con adaptadores en cada extremo, son utilizados como sustratos para reacciones de amplificación repetida sobre un portaobjetos que contiene secuencias de oligonucleótidos complementarios a un adaptador. Los oligonucleótidos en el portaobjetos están separados tal que el ADN, luego de ser sometido a rondas repetidas de amplificación, crea "grupos" clonales de aproximadamente 1000 copias de cada fragmento de oligonucleótido. Cada portaobjetos puede albergar millones de reacciones paralelas en racimo. Su sensibilidad en plasma se estima entre el 0.5% y 1% (285).

1.4.3.2.6. *Tecnología Safe-SeqS*

La tecnología Safe-SeqS (Safe Sequencing System) mejora la sensibilidad de la tecnología de secuenciación masiva (NGS) permitiendo detectar mutaciones de baja frecuencia, que la NGS tiene dificultades para detectar debido a errores que se producen en los distintos pasos del proceso de secuenciación y que la tecnología Safe-SeqS consigue evitar o minimizar. Está por ello, especialmente diseñada para la detección de variantes raras en tejido y para la detección de mutaciones en ADNtc en plasma u otros fluidos, siendo su sensibilidad de entre el 0.05% y el 0.1% (286).

Tabla 7. Sensibilidad estimada de las diferentes tecnologías de análisis mutacional empleadas para biopsia líquida.

Tecnología	Tipo de análisis mutacional*	Sensibilidad
ARMS	Dirigido	1%
castPCR™	Dirigido	0.1%-0.5%
PCR digital	Dirigido	0.01%-0.1%
BEAMing	Dirigido	0.01%-0.04%
NGS	No dirigido	0.5%-1%
SafeSeq	No dirigido	0.05%-0.1%

*El tipo de análisis puede ser “dirigido” si busca mutaciones en loci concretos o en puntos calientes (“hot spots”). Los análisis no dirigidos consisten en la secuenciación completa de un gen o región de un gen en búsqueda de mutaciones. Para más información véase texto principal y referencias.

1.4.4. ARN y MICRO-ARN TUMORAL CIRCULANTE

Otra modalidad de biopsia líquida es la búsqueda en el plasma y otros fluidos de fragmentos de ARN. Gran parte de la investigación se ha centrado en pequeños fragmentos de ARN no codificante, conocidos como microARN (miARN), que se encargan de regular la transcripción génica. Múltiples estudios en distintos tipos de cáncer sugieren su utilidad en el diagnóstico precoz y como marcador con valor pronóstico. Por otra parte, uno de los principales reservorios de ARN circulante en el plasma y también de miARN son las vesículas extracelulares (VECs), que se describen a continuación (287).

1.4.5. VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las VECs constituyen un campo inmenso de estudio, al estar involucradas en todo tipo de procesos biológicos y ser un reflejo de la composición biológica de la célula parental de la que proceden. Se distinguen varios tipos en base, fundamentalmente, a su tamaño. Las VECs más estudiadas en cáncer son los exosomas, constituidos por una bicapa lipídica de 30-120 nm y liberados a la sangre y otros fluidos tanto por células sanas como tumorales, aunque en mayor cantidad por estas últimas (288)(289). Los exosomas regulan múltiples procesos biológicos (angiogénesis, progresión tumoral, metástasis, inhibición de la respuesta inmunológica, resistencia a fármacos, etc) y representan una rica fuente de información molecular. Son especialmente ricos en ARNm y constituyen el reservorio más importante de ADN circulante en plasma (290). Además, se ha

demostrado que las mutaciones en el ADN de los exosomas reflejan, con elevada fiabilidad, el estatus mutacional de la célula parental de la que proceden (291). Esto ha permitido estudiar en exosomas de plasma algunas mutaciones como las de KRAS, p53 o IDH1 en cánceres de páncreas, colon y en tumores en teoría aislados de la circulación sistémica como los gliomas (292)(293). Los exosomas tumorales se pueden obtener de forma sencilla mediante ultracentrifugación diferencial habiendo podido aislarse en varios tipos de cáncer y fluidos biológicos como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido pleural o la saliva, identificándose por la expresión de CD63, CD9 o CD81, proteínas conocidas como tetraspaninas (289).

1.5. LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL CÁNCER COLORECTAL

1.5.1. Células Tumorales Circulantes (CTC)

En la mayor parte de los estudios con CTC en pacientes con CCR se empleó el sistema CellSearch®, demostrando una tasa de detección en la fase metastásica de entre el 12% y el 74% y una mediana de recuento < 3 CTC. Varios autores han establecido ≥ 3 CTC con el sistema CellSearch® como el punto de corte que mejor predice la supervivencia en pacientes con CCRm (Véanse **Tablas 5 y 8**) (171)(294)(172)(173). En un estudio de 430 pacientes con CCRm, la presencia de ≥ 3 CTC con el sistema CellSearch® se asoció a una peor SLP (4.4 m vs 7.8 m; $p=0.004$) y SG (9.4 vs 20.6 m; $p<0.0001$) (172). En 467 pacientes con CCRm del estudio CAIRO2, ≥ 3 CTC con el sistema CellSearch® se asoció a una peor SLP (8.1 vs 10.5 m; $p=0.003$) y SG (13.7 vs 22 m; $p<0.0001$) (173). Sastre y colaboradores (210) del grupo de CTC del Hospital Clínico San Carlos, en 158 de los 480 pacientes incluidos en el estudio MACRO, estudiaron el aislamiento de CTC mediante CellSearch®. Los pacientes con < 3 CTC y tumores KRAS nativos tuvieron una SLP y SG significativamente más largas que los pacientes con ≥ 3 CTC y tumores KRAS mutados (SLP: 14.2 vs 6.2 m, HR 3.0, IC95% 1.8-5.2, $p<0.0001$) (SG: 28.9 vs 13.7 m, HR 2.8, IC95% 1.6-4.9, $p=0.0004$). En el análisis multivariante CTC ≥ 3 y el estatus de KRAS fueron los únicos factores pronósticos independientes para la SLP y SG. Por el contrario, en el contexto localmente avanzado, Sotelo y colaboradores (295), -también del grupo de CTC del Hospital Clínico San Carlos-, en un estudio prospectivo de 519 pacientes con CCR en estadio III, detectaron mediante CellSearch® ≥ 1 CTC en el 35%, ≥ 2 CTC en el 20%, ≥ 3

CTC en el 13% y ≥ 5 CTC en el 7% de los pacientes, pero ningún punto de corte demostró capacidad pronóstica para la recaída y la SG.

Estudios más pequeños han demostrado, mediante diferentes sistemas de enriquecimiento, el valor pronóstico del recuento de CTC antes de la cirugía del tumor primario y de la resección de metástasis hepáticas o pulmonares (296)(297)(298)(299)(300)(301).

Una mayoría de los trabajos con CTC en CCR, no llevaron a cabo estudios moleculares, sino que se limitaron al recuento de CTC y a analizar su valor pronóstico. No obstante, aquellos, que bien mediante CellSearch® o bien empleando otros sistemas de enriquecimiento, llevaron a cabo análisis moleculares, han demostrado, como se describe a continuación, la viabilidad de la caracterización molecular de las CTC (188)(189)(181)(229)(210)(296)(297)(298)(299)(300)(301)(183)(302)(184)(303)(185)(159)(304)(305)(306)(307)(308)(309)(310)(311)(312)(186)(313)(314)(315). En la **Tabla 8** se resumen los estudios más relevantes en CCRm que han llevado a cabo estudios moleculares en CTC.

Matikas y colaboradores (303), emplearon el sistema de detección de CTC por tamaño ISET, en muestras de 15 pacientes con CCRm RAS y BRAF nativo, obtenidas en 3 momentos. antes de iniciar la 1ª línea de tratamiento, en el momento de la primera evaluación radiológica y en la progresión. Se estudiaron las mutaciones en el exón 2 de KRAS en ADN de CTC mediante PCR cuantitativa (qPCR). En el 60% de los casos al menos una de las muestras de CTC fue positiva para la mutación en KRAS. En 11/28 muestras obtenidas (39.2%) con CTC detectadas, se encontró alguna mutación en el exón 2 de KRAS, siendo así en el 27% de las muestras de CTC basales y en el 37.5% de las obtenidas a la progresión. Las mutaciones más frecuentes fueron la G13D y la G12C. La detección de mutaciones en KRAS en CTC no fue predictiva de supervivencia, y la cinética del recuento de CTC no reflejó el patrón de respuesta tumoral.

Kondo y colaboradores (185), estudiaron mediante el sistema CellSearch, muestras de sangre de 61 pacientes con CCRm. Se detectaron CTC en 27 de los casos, en 15 de los cuales se contaron ≥ 2 CTC. Las CTC fueron recuperadas mediante un sistema de aislamiento de célula única basado en fluorescencia para el análisis mutacional del exón 2 de KRAS. Se detectaron 15 CTC con mutación de KRAS en 4 pacientes entre un total de 284 células analizadas de 11 pacientes. En 10/11 pacientes el estatus de KRAS fue

coincidente entre las CTC y el tumor primario. En 2 pacientes se detectaron varias mutaciones de CTC diferentes entre cada célula.

Kidess-Sigal y colaboradores (159), obtuvieron 41 muestras de sangre de 15 pacientes con CCRm antes y después de la cirugía de metastasectomía hepática. Para la detección de CTC se empleó tecnología no dirigida basada en la centrifugación tipo Vortex. Se comparó el perfil mutacional de KRAS, BRAF y PIK3CA en 23 muestras de CTC y ADNtc, 9 metástasis hepáticas y 3 tumor primarios. Se detectaron CTC en el 80% de las muestras obtenidas, siendo en el 81.4% CTC EpCAM+. La concordancia entre las CTC y el ADNtc fue del 78.2% para las mutaciones en KRAS, 73.9% para BRAF y 91.3% para PIK3CA. En varios casos, se detectaron mutaciones en CTC que no se detectaron en el ADNtc, y a la inversa.

Mohamed Suhaimi y colaboradores (305), emplearon un método de aislamiento de CTC no dirigido desarrollado por ellos, basado en la detección por tamaño por microfiltrado. Obtuvieron sangre de 44 pacientes con CCR en estadios localizados y avanzado. Empleando High Resolution Melting (HRM) y una PCR alelo específica para el estudio de mutaciones en el exón 2 de KRAS y la mutación V600E de BRAF, detectaron mutaciones de KRAS en CTC por HRM en 14/44 casos (31.8%) y la mutación de BRAF en 5/44 (11.3%) pacientes. La PCR alelo-específica detectó estas mismas mutaciones en el 22.7% y 2.3% de los casos. La concordancia en el perfil mutacional de KRAS y BRAF entre el tumor primario y las CTC por HRM fue del 84.1% y del 90.9%, respectivamente.

Kalikaki y colaboradores (183), obtuvieron 48 muestras de sangre de 31 pacientes con CCRm PIK3CA y BRAF nativos. De los 31 pacientes, 14 tenían tumores KRAS mutados. Se detectaron CTC mediante CellSearch en el 65% de las muestras y en el 74% de los pacientes. Se detectó la mutación de KRAS en CTC en el 45% y 16.7% de los pacientes con tumores KRAS mutados y KRAS nativos, respectivamente. El estudio de muestras seriadas también reveló cambios en el estatus de KRAS en CTC a lo largo del tratamiento. Steinert y colaboradores (307), empleando CTC de pacientes con CCRm detectadas con el sistema CellSearch realizaron diversos estudios moleculares en célula única. Las CTC mostraron mutaciones en KRAS o TP53 no detectables en el tumor primario, así como diferencias en el estatus mutacional entre CTC de un mismo paciente. Además, mostraron la detección de inestabilidad de microsatélites en las CTC, que igualmente era variable entre distintas CTC de un mismo paciente. Por último, los autores

observaron la sobreexpresión de CD47, relacionada con el escape inmunológico, a la vez que la infraregulación de otras vías relacionadas con la activación inmune, sugiriendo la existencia de un fenotipo evasor del sistema inmunológico en las CTC.

Harb y colaboradores (181), demostraron la recuperación de CTC, en estudios de spike-in, en el 90% y 40% de los casos mediante IsoFlux™ y CellSearch®, respectivamente. En muestras de 14 pacientes con CCR en estadios II-IV, detectaron ≥ 4 CTC en el 87%. Empleando castPCR detectaron mutaciones en KRAS en CTC en el 50% de los casos, siendo en el 46% de los casos discordante con el estatus de KRAS en el tumor primario. Heitzer y colaboradores (308), empleando el sistema CellSearch®, detectaron CTC en 21/37 pacientes con CCRm. En 6 pacientes consiguieron aislar 37 CTC intactas detectando múltiples cambios en el número de copias (CNC) asociados al CCR, muchos de los cuales también fueron detectables en el tumor primario. Por último, emplearon secuenciación masiva de 68 genes relacionados con el CCR, y estudiaron muestras del tumor primario, metástasis y de las CTC de 2 de los pacientes, detectando mutaciones en APC, KRAS y PIK3CA en las CTC también detectables en tumor, si bien algunas fueron exclusivas de las CTC. Al aplicar secuenciación en profundidad, estas variantes detectadas solo en las CTC estaban en realidad presentes en el tumor primario a nivel subclonal.

Gasch y colaboradores (188) emplearon el sistema CellSearch® para el estudio de CTC en sangre de 49 pacientes con CCRm y 32 pacientes con CCR no metastásico (CCRnm). Estudiaron la expresión de EGFR en 741 CTC de 27 pacientes con CCRm y de 6 pacientes con CCRnm, mediante el estudio en célula única de la expresión de EGFR, y el estatus mutacional de KRAS, BRAF y PIK3CA. Se detectaron ≥ 2 CTC en 24/49 pacientes con CCRm y en 7/32 pacientes con CCRnm. En 7/33 casos se observó la sobreexpresión de EGFR en CTC, detectándose, sin embargo, heterogeneidad entre distintas CTC de un mismo paciente. Se detectó la amplificación de EGF en 7/26 CTC de 3 pacientes. Se detectaron mutaciones en KRAS en 5 de 15 CTC de 1 paciente y de PIK3CA en 14 de 36 CTC de 4 pacientes.

Yen y colaboradores (309), emplearon un método de aislamiento de CTC basado en un array de membrana para el estudio de 76 pacientes con CCR en tratamiento con Cetuximab en combinación con FOLFIRI o FOLFOX4. El 43.4% tenían tumores KRAS mutados, encontrándose también un estatus KRAS mutado en el 39.5% de las muestras

de CTC, y observaron una elevada correlación en las mutaciones de KRAS entre el tumor y las CTC. El estatus KRAS nativo en CTC se asoció a una mayor SLP y SG en los pacientes del estudio.

En el estudio en fase II Unicancer Prodiges-14, Bidard y colaboradores (186), compararon la detección de CTC mediante CellSearch® y estudio de la mutación de KRAS en ADNtc mediante PCR digital en n=153 pacientes tratados con un doblete o un triplete de quimioterapia en combinación con terapias dirigidas. Observaron como la proporción de pacientes con recuento de CTC ≥ 3 disminuía entre la determinación basal (19%), a las 4 semanas del tratamiento (3%) y antes de la cirugía (0%). Mientras que el porcentaje de pacientes positivos para la mutación de KRAS en ADNtc fue del 91%, este también disminuyó durante el tratamiento quimioterápico. La persistencia de la detección de la mutación de KRAS en ADNtc a las 4 semanas del tratamiento y antes de la cirugía, se asociaron, respectivamente, a una menor tasa de resección hepática R0/R1, y a una < SG.

Onstenk y colaboradores (229), se preguntaron si el perfil mutacional de las CTC se parecía más al del tumor primario o al de las metástasis hepáticas en pacientes con CCR. Para ello, obtuvieron muestras para el estudio de CTC en 23 pacientes antes de la cirugía de metastasectomía hepática. Para el recuento de CTC emplearon el sistema CellSearch y posteriormente analizaron el perfil mutacional de 25 genes habitualmente alterados en el cáncer de colon y en las CTC mediante RT-qPCR. El perfil mutacional de las CTC fue concordante con el de las metástasis hepáticas en el 74% de los casos (17/23) y con el del tumor primario en el 57% de los casos (13/23). El perfil de las CTC reflejó mejor el de las metástasis hepáticas en el 57% de los casos frente al 22% en que reflejó mejor el del tumor primario.

En un meta-análisis que incluyó a 244 pacientes de 9 estudios, se observó que la incidencia de mutaciones en KRAS en CTC era mayor, igual y menor que la del tumor primario en los estadios precoces (I y II), localmente avanzados (III) y metastásicos (IV), respectivamente. Parece, por tanto, existir mayor discordancia en el estatus de KRAS entre el tumor primario y las CTC en los estadios más avanzados, posiblemente debido a la mayor heterogeneidad intratumoral a medida que el cáncer evoluciona (302).

Tabla 8. Estudios más relevantes en pacientes con CCR que han llevado a cabo estudios moleculares en CTC.

Autor	Sistema de detección de CTC	n (pacientes)	n (muestras)	Tasa de detección de CTC	Valor pronóstico	Estudios moleculares
Kalikaki (2014)	CellSearch	31 CCR IV PIK3CA y BRAF NAT	48	65% muestras 74% pacientes	-	45% KRAS ^{MUT} en tumor CTC KRAS ^{MUT} en 45% tumores KRAS ^{MUT} CTC KRAS ^{MUT} en 16.7% de KRAS ^{NAT} Cambios en estatus KRAS en CTC durante tratamiento
Liu (2017)	Meta-análisis estudios	9 244 CCR estadios I- IV	-	-	-	% KRAS ^{MUT} en CTC vs tumor 1º (elevada discordancia): > en estadio precoz, = en LA, < en metastásico
Kong (2017)	Microfiltración no dirigida basada en sílice	48 CCR LA	48 pre- cirugía	100%	-	NGS 39 genes en tumor 1º y CTC: concordancia en 60%
Matikas (2017)	ISET (tamaño)	15 CCR IV RAS & BRAF NAT	45 (pre-1º L, 1º eval y PD)	63%	CTC KRAS ^{MUT} no predictiva de respuesta Cinética de CTC no predictiva de respuesta ni supervivencia	Mutaciones KRAS exón 2 qPCR en CTC: 60% ≥ 1 muestra de CTC KRAS ^{MUT} -Pre-Cx: 27% CTC KRAS ^{MUT} -PD: 37.5% CTC KRAS ^{MUT} -Mut > frec en CTC: G13D, G12C
Kondo (2017)	CellSearch	61 CCR IV	61	44% 25% (≥ 2 CTC)	-	Mutaciones KRAS exón 2 en célula única: 15/284 CTC KRAS ^{MUT} en 11 pts En 2 pts varias mutaciones en CTC diferentes entre cada CTC
Kidess-Sigal (2016)	Centrifugación tipo Vórtex no dirigida	15 CCR IV	41 (pre- y post-cirugía mtx hepática)	80% de muestras 81.4% CTC EpCAM+	-	Mutaciones KRAS, BRAF, PIK3CA en 23 muestras de CTC y ADNtc, 9 mttx hepáticas y 3 tumores 1º Concordancia mut KRAS, BRAF, PIK3CA CTC-Tumor 1º: 78.2%, 73%, 91.3% En varios casos detección de mutaciones en CTC y no en ADNtc y a la inversa
Suhaimi (2015)	Detección por tamaño y microfiltración	44 CCR estadios II- IV	44	-	-	Mutaciones KRAS exón 2 y mutación BRAF V600E en CTC Mutaciones KRAS en CTC en 31.8% (HRM) y 22.7% (PCRAE) Mutación BRAF en CTC en 11.3% (HRM) y 2.3% (PCRAE) Concordancia Tumor 1º - CTC estatus KRAS: 81% Concordancia Tumor 1º - CTC estatus BRAF: 99.9%
Shigeyasu (2015)	Aislamiento CTC vivas empleando adenovirus atenuado	8 CCR KRAS ó BRAF MUT	8	100%	-	Mutaciones en KRAS ó BRAF en 2/8 casos
Steinert (2014)	CellSearch	31 CCR IV	31	58%	-	Mutaciones en KRAS y TP53 en CTC no detectables en tumor 1º Detección de MSI en CTC Mutaciones y MSI variables entre CTCs de un mismo paciente Expresión marcadores de evasión inmune (CD47) en CTC
Harb (2013)	IsoFlux (IA en sistema microfluído)	Estudios Spike In Pacientes: 14 CCR II-IV	14	86%	Spike In: 90% IsoFlux y 40% CellSearch Pacientes: ≥ 4 CTC en 87%	Mutaciones en KRAS en CTC por castPCR en 50% (46% de ellos discordante con tumor 1º)

Heitzer (2013)	CellSearch	37 CCR IV	37	57%	Asociación de CTC+ con < TCE, SLP, y SG	En 6 pts aislaron 37 CTC intactas, detectando múltiples CNVs descritas en CCR y detectables en el tumor 1º NGS de 68 genes en tumor 1º - metástasis - CTC en 2 pacientes: mutaciones en APC, KRAS y PIK3CA en CTC y en tumor 1º, aunque algunas exclusivas de las CTC (aunque presentes en 1º a nivel subclonal)
Mostert (2013)	CellSearch	43 CCR IV	43 pre-Cx mtz hep	62% (Mediana CTC: 1)	-	PCRAE: muts KRAS ó BRAF en 14% (poco concordantes con tumor 1º o mtz)
Gasch (2013)	CellSearch	49 CCR IV 32 CCR II-III	-	≥ 2 CTC en 49% CCR IV y en 22% CCR II y III	-	Expresión EGFR (21%), estatus KRAS (5/15 CTC), BRAF y PIK3CA (14/36 CTC) en 741 CTC de 27 pts CCR IV y en 6 pts CCR II-III. Heterogeneidad expresión EGFR entre CTC de un mismo paciente.
Yen (2009)	Array de membrana	76 CCR Folfiri-Cetuximab vs Folfx4-Cetuximab	76	-	Mejor PFS y OS de KRAS ^{NAT} en CTC	43.4% Tumor KRAS ^{MUT} 39.5% CTC KRAS ^{MUT} Buena correlación estatus KRAS entre Tumor y CTC CTC KRAS ^{NAT} > SLP y > SG
Ribeiro-Samy (2019)	CROSSChip (tamaño y deformabilidad) vs CellSearch	9 CCR IV	-	≥ 3 CTC CROSSChip: 7/9 ≥ 3 CTC CellSearch: 0/9	> Recuento con CROSSChip y mejor clasificación Px	Mutaciones en APC en mayoría de CTC por CROSSChip
Bidard (2019)	UNICANCER/PRODIGE-14 CellSearch vs ADNtc (PCR digital)	153 CCR IV	153	≥ 3 CTC: 25/132 (19%)	≥ 3 CTC basal: 19% ≥ 3 CTC post-4wk: 3% ≥ 3 CTC pre-Cx: 0%	ADNtc KRAS ^{MUT} basal: 91% ADNtc KRAS ^{MUT} a las 4wk y pre-Cx asociación a < tasa resección hepática y < SG
Onstenk (2016)	CellSearch	23 CCR IV con mtz hep	23 pre-Cx mtz hep	≥ 3 CTC: 6/23 (26%)	Asociación de CTC con estadio más avanzado y < SLP, < SG	Perfil mutacional NGS de 25 genes concordante entre CTC y mtz hep en 74% y con tumor 1º en 57%

BEAMing: Beads, emulsion, amplification and magnetics, castPCR: competitive allele specific Taqman PCR, CCR: cáncer colorrectal, CTC: células tumorales circulantes, HRM: high-resolution melting, IA: método de detección por inmunoafinidad, ISET: método de "aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales" (por sus siglas en inglés), NAT: nativo, MUT: mutado, qPCR: PCR cuantitativa, Px: pronóstico, RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real, (-): información no disponible o no aplicable.

1.5.2. ADN Tumoral Circulante (ADNtc)

Como se expone a continuación, la mayor parte de los estudios existentes sobre ADNtc han empleado abordajes *dirigidos* a la identificación de mutaciones en loci recurrentes o en puntos calientes ("hot spots") de los genes de interés. Dada la elevada frecuencia de las mutaciones en RAS (45-55%) la mayoría de trabajos se han centrado en su estudio. Gran parte de ellos han empleado la tecnología BEAMing, demostrando, que es, a día de hoy, la tecnología de mayor sensibilidad para la detección, en plasma, de mutaciones en "puntos calientes" de KRAS y NRAS en pacientes con CCRm (283)(316)(317)(318)(319)(320)(321)(322)(323). En la **Tabla 9** se resumen los estudios más relevantes con ADNtc en CCR.

García y colaboradores (316), compararon tres tecnologías de secuenciación de alta sensibilidad (PCR digital, BEAMing y NGS) para el análisis de RAS en muestras de ADNtc de pacientes con CCR obtenidas en el momento del diagnóstico. Los resultados se cotejaron también entre el plasma y el tejido tumoral. Observaron una concordancia muy alta entre el estatus mutacional en el tumor y en ADNtc. El umbral de detección en ADNtc para la PCR digital y para la NGS fue del 0.5-1%, y del 0.03% con BEAMing. Al comparar el resultado en tejido frente al ADNtc por PCR digital la sensibilidad y especificidad en ADNtc fue del 47% y 77%, respectivamente. Al comparar el tejido con el ADNtc analizado por BEAMing la sensibilidad fue del 93% y la especificidad del 69%. Por último, al emplear la NGS en ADNtc y compararlo con el tumor, la sensibilidad fue del 73% y la especificidad del 77%.

En el estudio CAPRI-GOIM en pacientes con CCR KRAS exón 2 nativos que recibieron en 1ª línea tratamiento con FOLFIRI-Cetuximab, se analizó el estatus de RAS (KRAS y NRAS) en ADNtc mediante BEAMing. En los casos discordantes con el tumor primario, se reanalizaron empleando PCR digital (ddPCR) o secuenciación masiva (NGS). Se analizaron 92 casos mediante NGS en el tumor y mediante BEAMing en plasma, detectando mutaciones en RAS en el 35.9% de los casos. La concordancia entre el tejido y el ADNtc fue del 78.3%, dado que hubo 10 casos mutados en tumor y nativos en plasma, y otros 10 casos nativos en tumor y mutados en plasma. Las diferencias en SLP y SG entre los casos mutados y nativos en tejido, fueron equiparables a las encontradas entre los casos mutados y nativos en ADNtc, sugiriendo que la determinación en plasma es válida para determinar el estatus de RAS en pacientes con CCR avanzado previo al inicio de la 1ª línea de quimioterapia con anti-EGFR (317).

Schmiegel y colaboradores (318), en una serie de 98 pacientes con CCR en estadios III (8.2%) y IV (91.8%) de nuevo diagnóstico (71.4%) o no (28.6%), se comparó el estatus de RAS en tejido (analizado mediante pirosecuenciación, secuenciación Sanger o mediante NGS) con el estatus de RAS en ADNtc mediante BEAMing. El 53.1% resultó KRAS mutado en tejido, frente al 51% en plasma. Por tanto el porcentaje de acuerdo positivo (PAP) en el estatus de RAS entre el plasma y el tumor fue del 90.4% (47/52) y el negativo (PAN) fue del 93.5% (43/46), y la concordancia global alcanzó el 91.8% (90/98), demostrando así que el análisis de RAS en plasma es una alternativa válida al estudio en tejido.

Vidal y colaboradores (319), en una serie de 115 pacientes con CCRm se estudió mediante BEAMing el estatus de RAS en ADNtc y se compararon los resultados con el del tumor, encontrando una concordancia del 93%. En este estudio, la monitorización de los pacientes RAS mutados mediante ADNtc, permitió anticipar la respuesta radiológica al tratamiento con QT en combinación con antiangiogénicos, y en los pacientes RAS nativos tratados con anti-EGFR, la monitorización permitió detectar la aparición de clonas RAS mutadas como posible mecanismo de resistencia.

Bachet y colaboradores (324), en un estudio de 412 pacientes con CCRm, observaron una concordancia entre el tumor primario y el plasma analizado por NGS del 85.2% y al combinar la NGS con el análisis de metilación por PCR digital, la concordancia alcanzó el 94.8%, fundamentalmente a expensas de los pacientes con metástasis hepáticas.

Sclafani y colaboradores (325), estudiaron, mediante PCR digital, mutaciones en KRAS y BRAF en ADNtc de plasma de 97 pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado participantes en el estudio en fase II EXPERT-C, en el que los pacientes eran tratados con CAPOX → QT-RT → Cirugía → CAPOX +/- Cetuximab adyuvante. Se detectaron mutaciones de KRAS en plasma en la población KRAS mutada en tejido en el 66% de los casos. En el 35% de los pacientes KRAS nativos en tejido por métodos estándar, se detectaron mutaciones en G12D, G12V o G13D en plasma. Asimismo, en 26 pacientes, el ADNtc reveló mutaciones en KRAS no previamente detectadas en tejido por métodos estándar, que luego si fueron detectadas por PCR digital en el tejido en 22 pacientes.

Bando y colaboradores (320), en un estudio de 280 pacientes con CCRm no tratados previamente con anti-EGFR, encontraron una concordancia entre el tumor primario y el plasma -este último estudiado mediante BEAMing- del 86.4%. Los 31 pacientes con metástasis pulmonares únicamente, mostraron la menor tasa de concordancia (64.5%) debido probablemente al escaso volumen de enfermedad. En estos pacientes, la concordancia alcanzó el 100% para aquellos con un enfermedad ≥ 20 mm de diámetro máximo o con ≥ 10 lesiones metastásicas.

García-Foncillas y colaboradores (321), estudiaron a 236 pacientes con CCRm mediante BEAMing, encontrando una concordancia del 89% para el estatus de RAS entre el tumor primario y el ADNtc. En los casos discordantes, se reanalizó el tumor primario por BEAMing encontrando 2 casos falsos negativos y 5 casos falsos positivos, con lo que la

concordancia final aumentó al 92%. Al igual que el estudio anterior, el mayor porcentaje de discordancia se encontró entre los casos con metástasis pulmonares exclusivamente. En otro estudio realizado en 10 centros españoles, se comparó el estatus de KRAS entre el tumor primario y el plasma empleando dos tecnologías en plasma: BEAMing y el sistema Idylla. En 116 pacientes KRAS mutados en plasma por BEAMing con una FAM <5%, Idylla detectó la mutación en plasma en el 69.8% (81/116) y el 60.7% (48/79) de los casos con una FAM <1%, demostrando la mayor sensibilidad de la tecnología BEAMing para la detección de mutaciones en KRAS en ADNtc (322).

En el estudio CORRECT, Tabernero y colaboradores (283), en 503 pacientes con CCRm tratados con regorafenib en 3ª y sucesivas líneas emplearon BEAMing para el estudio de mutaciones en KRAS, PIK3CA y BRAF en ADNtc. BEAMing identificó mutaciones en KRAS en el 69%, en PIK3CA en el 17% en BRAF en el 3% de los casos. De los 86 pacientes KRAS nativos en tumor y que habían recibido tratamiento con anti-EGFR, el 48% tuvieron mutaciones en KRAS detectables por BEAMing en ADNtc. El estudio también reveló, que el beneficio en SLP de regorafenib vs placebo fue diferente en función del estatus mutacional de KRAS y PIK3CA en plasma.

En un estudio en 119 pacientes con CCRm vírgenes de tratamiento para la enfermedad avanzada, se detectaron mutaciones en ADNtc en KRAS en el 59%, en NRAS en el 11.8% y en BRAF en el 14.4%, frente al 44%, 8.8% y 7.2%, respectivamente en el tumor primario. Es decir, en ADNtc se detectó un mayor porcentaje de casos mutados que en tejido sólido. Los casos no mutados en ADNtc ni en RAS ni en BRAF, fueron tratados con quimioterapia combinada con agentes anti-EGFR, observándose el beneficio esperado por el tratamiento para tumores RAS y BRAF nativos en el tumor. Además, se demostró la existencia de varias mutaciones sincrónicas en RAS y BRAF al hacer el estudio en ADNtc, resultando no mutados sólo el 24% de los casos y demostrándose hasta 5 mutaciones diferentes en el 45% de los casos (326).

Empleando BEAMing para el estudio de mutaciones en KRAS y en EGFR en ADNtc en 62 pacientes con CCRm KRAS nativo en progresión a tratamiento con agentes anti-EGFR, se detectaron nuevas mutaciones en plasma en KRAS en el 44% de los casos y en EGFR en el 8%. La fracción alélica mutada (FAM) fue mayor a menor tiempo transcurrido desde el último tratamiento anti-EGFR. Además, en 20 de los 62 pacientes se estudiaron mutaciones en KRAS por BEAMing. En 7 de estos 20 pacientes (35%) se observaron las

mismas mutaciones detectadas en ADNtc aunque con una FAM baja. Al comparar estos 7 casos frente a los 13 restantes en los que BEAMing no detectó mutaciones en tumor, se observó que la SLP durante el tratamiento anti-EGFR era significativamente más corta (3 vs 8 meses, $p=0.0004$). Estos resultados llevan a la conclusión de que las mutaciones de nueva aparición detectadas en KRAS y/o EGFR en ADNtc de plasma, parecen derivar de pequeñas clonas pre-existentes ya en el tumor primario. En uno de los pacientes del estudio, KRAS y EGFR nativo en el tumor, BEAMing detectó mutaciones de nueva aparición en KRAS y EGFR en el momento de la progresión al tratamiento anti-EGFR. La FAM de estas alteraciones en plasma se incrementó tras reintroducir el tratamiento con anti-EGFR, indicando que la representación clonal es cambiante a lo largo del tiempo y obedece, en parte, a la presión de selección ejercida por los tratamientos (323).

Siravegna y colaboradores (327), en pacientes con CCRm en tratamiento con anti-EGFR demostraron que la FAM de KRAS en plasma disminuía al suspender el tratamiento y volvía a aumentar al reintroducirlo y viceversa, sugiriendo un mecanismo biológico explicativo de porqué algunos pacientes se benefician de la reintroducción de los agentes anti-EGFR.

El fenómeno de la emergencia de mutaciones con la presión terapéutica, también ha sido demostrado por otros autores en estudios más pequeños (275)(276)(327)(328)(329).

En su conjunto, todos estos estudios demuestran, que, al menos las mutaciones en RAS y BRAF, pueden ser estudiadas en ADNtc con una muy elevada concordancia con el tumor primario.

Varios ensayos clínicos han incorporado a su diseño el estudio molecular mediante ADNtc de plasma en pacientes con CCRm tratados con agentes dirigidos frente a EGFR (NC02484833, NCT02980510), frente a EGFR y MEK (NCT03087071) y frente a HER2 (UMIN000027887) (330).

Tabla 9. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CCR.

Autor	n	Tecnología	Tasa de detección	Especificidad	Conclusiones
García (2018) (316)	25 CCR IV	Mutaciones en RAS por PCR digital vs BEAMing vs NGS	-PCR digital en ADNtc (vs Tumor): S=47% -BEAMing en ADNtc (vs Tumor): S=93% -NGS en ADNtc (vs Tumor): S=73%	-PCR digital en ADNtc (vs Tumor): E=77% -BEAMing en ADNtc (vs Tumor): E=69% -NGS en ADNtc (vs Tumor): E=77%	Beaming demostró mayor VPP y VPN que los otros métodos
Bachet (2018) (324)	412 CCR IV	NGS Análisis de metilación por PCR digital	Concordancia: -NGS Tumor-Plasma: 82.5% -NGS + metilación PCR digital Tumor-Plasma: 94.8% Concordancia en pts con mtz hepáticas: -NGS Tumor-Plasma: 93.5% -NGS + metilación PCR digital Tumor-Plasma: 97%		
Bando (2019) (320)	280 CCR IV	BEAMing	Concordancia: -Tumor-Plasma: 86.4% -Pacientes con mtz pulmonares solo: 64.5% -Pacientes con mtz pulmonares con ≥ 20 mm ó ≥ 10 mtz: 100%		Elevada concordancia Tumor-Plasma pero dependiente de la carga tumoral (> concordancia a > carga tumoral)
García-Foncillas (321)	236 CCR IV	BEAMing	Concordancia: -Tumor (PCR estándar)-Plasma (BEAMing): 89% -Tumor-Plasma (BEAMing en ambos): 92%		Elevada concordancia Tumor-Plasma para elegir tratamiento anti-EGFR
Normanno (2018) (317)	Estudio CAPRI-GOIM CCR IV KRAS Exon 2 NAT tratados con Folfiri-Cetuximab	BEAMing en ADNtc PCR digital o NGS en Tumor	ADNtc: KRAS MUT 35.9% -		-Concordancia Tumor-ADNtc: 78.3% En casos discordantes, la PCR digital y NGS en tumor confirmaron mutaciones por BEAMing en ADNtc -ADNtc predice supervivencia al igual que en tumor
Schmiegel (2017) (318)	98 CCR III-IV	Estatus RAS Pirosecuenciación vs Secuenciación Sanger vs NGS	Tejido: 53.1% KRAS ^{MUT} ADNtc: 51% KRAS ^{MUT}		-Concordancia Tejido-Plasma 91.8% -Análisis de RAS en plasma es alternativa válida al estudio en tejido
Vidal (2017) (319)	115 CCR IV	Estatus RAS por BEAMing en tejido y ADNtc	Tejido: 47.8% KRAS ^{MUT} ADNtc: 51.3% KRAS ^{MUT}		Concordancia 93% Detección de mutación en RAS anticipó respuesta radiológica Detección de clonas RAS mutadas como mecanismos de resistencia a anti-EGFR
Tabernero (2015) (283)	503 CCR IV tratados con regorafenib (Estudio CORRECT)	BEAMing (KRAS, PIK3CA, BRAF) en ADNtc	Porcentaje MUT en ADNtc: -KRAS: 69% -PIK3CA: 17% -BRAF: 3%		-De los 86 pts KRAS ^{NAT} en tumor tratados con anti-EGFR el 48% KRAS ^{MUT} en ADNtc -Beneficio de regorafenib fue diferente según estatus KRAS y PIK3CA en ADNtc
Thierry (2017) (326)	119 CCR IV pre-1ª L	KRAS, NRAS, BRAF	-Tejido: *KRAS: 44% *NRAS: 8.8% *BRAF: 72.2% -Plasma: *KRAS: 59% *NRAS: 11.8% *BRAF: 14.4%		-Coexistencia de varias muts en rAs y BRAF en plasma, con 5 muts diferentes hasta en 45%
Morelli (2015) (323)	62 CCR IV en PD a anti-EGFR	BEAMing (KRAS, EGFR) en ADNtc	-ADNtc: 27/62 (44%)		-Detección nuevas muts en plasma en KRAS en 44% y en EGFR en 8% -FAM > a < tiempo transcurrido desde último anti-EGFR -Detección de muts en KRAS en tumor se asoció < SLP (resistencia) a anti-EGFR -FAM cambiante en función de presión terapéutica por anti-EGFR

Vivancos (2019) (322)	116 CCR IV	BEAMing vs Idylla para KRAS en plasma	-FAM<5%: *BEAMing: 37/37 (100%) *Idylla: 33/37 (89.2%) -FAM<1%: *BEAMing: 63/63 (100%) *Idylla: 41/63 (65.1%) -FAM<0.1%: *BEAMing: 16/16 (100%) *Idylla: 7/16 (43.8%)		-SLP más corta con FAM ≥1% vs <1% -BEAMing más sensible que Idylla, especialmente con MAF <1%
Misale (2012) (276)	14 CCR IV tratados con QT sin anti-EGFR 10 CCR IV tratados con anti-EGFR	PCR digital	Mutaciones en KRAS en plasma: -Anti-EGFR-naïve: 0/14 -En PD a anti-EGFR: 6/10 (60%)		-Detección de muts en KRAS en plasma en 60% durante el tto con anti-EGFR anticipando PD radiológica
Díaz (2012) (275)	28 CCR IV KRAS ^{NAT} tratados con Panitumumab en monoterapia	PCR digital	Mutaciones en KRAS en plasma: -10/28 (38%)		-3 pts múltiples muts en KRAS en plasma -Muts aparecieron a los 6 m del inicio del tratamiento con panitumumab, aunque presentes en el tumor a nivel subclonal
Siravegna (2015) (327)	100 CCR IV en tto con anti-EGFR 26 CCR IV RAS ^{NAT} resistentes a anti-EGFR	<u>Genes estudiados:</u> KRAS, NRAS, MET, ERBB2, FLT3, EGFR, MAP2K1, <u>Métodos:</u> PCR digital, BEAMing, NGS	Mutaciones en plasma: Vía de RAS: 97/100 (97%) ERBB2: 4/100 (4%) FLT3: 1/100 (1%) MAP2K1: 1/100 (1%)	-	-Comportamiento dinámico de mutaciones en RAS -FAM de KRAS en plasma disminuía al suspender el tto con anti-EGFR y volvía a aumentar al reintroducirlo y viceversa
Siena (2018) (328)	76 CCR IV tratados con CPT-11 + Panitumumab	Tumor: NGS Plasma: BEAMing	Mutaciones de RAS en plasma: 11/30 (36.7%)	-	-Emergencia de mutaciones en RAS en 36.7% por presión terapéutica -Tiempo medio desde la emergencia de mutaciones en RAS hasta la PD: 3.6 meses
Onidani (2019) (329)	7 CCR IV pre-tto con anti-EGFR y en PD	CTC vs ADNtc mediante NGS	Detección muts en CTC o ADNtc en los 7 pts		-Mayoría de mutaciones detectadas en momento de PD -Detección de mutaciones en CTC y ADNtc en 2/7 casos
Sciafani (2018) (325)	97 Adenocarcinoma de recto LA (Estudio EXPERT-C)	PCR digital	-Detección muts KRAS en plasma en 66% de los KRAS ^{MUT} en tejido. -Detección muts KRAS en plasma en 35% de KRAS ^{NAT} en tejido		-En 26 pts no muts en tejido por RT-PCR, PCR digital detectó mutación KRAS en plasma (22/26 resultaron KRAS ^{MUT} en tejido por PCR digital)

ADNtc: ADN tumoral circulante, BEAMing: Beads, emulsion, amplification and magnetics, CCR: cáncer colorrectal, CPT-11: irinotecan, CTC: células tumorales circulantes, E: especificidad, EGFR: epidermal growth factor receptor, FAM: fracción alélica mutada, LA: enfermedad localmente avanzada, mtz: metástasis, n: número, NGS: secuenciación masiva, PD: progresión, pts: pacientes, RT-PCR: PCR en tiempo real, SLP: supervivencia libre de progresión, S: sensibilidad, VPN: valor predictivo negativo, VPP: valor predictivo positivo.

1.6. LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El número de estudios de biopsia líquida en el CCC es sensiblemente menor que en el CCR y que en otros tumores sólidos más frecuentes, y además se basan, en su mayoría, en muestras pequeñas. Esto se debe a varios factores. En primer lugar la incidencia del CCC oscila entre el 5º y el 7º puesto en la mayor parte de los países, lejos, por tanto, del CCR que ocupa el 1º o el 2º puesto. En segundo lugar, el peor conocimiento de la biología del CCC en comparación con otros cánceres, sumado a la ausencia de mutaciones frecuentes en loci concretos o en “puntos calientes” de genes de interés, dificultan el empleo de métodos de detección “dirigidos” a una diana molecular, siendo esto especialmente cierto en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC), el

tipo histológico más frecuente en esta entidad (331)(332). A continuación se describen los estudios más relevantes con biopsia líquida en el CCC hasta la fecha. Por razones de interés y de espacio, me centraré en las CTC y en el ADNtc como modalidades a discutir, si bien existen también algunos estudios empleando miARNs y VECs en pacientes con CCC, cuya referencia adjunto por si fueran del interés del lector (333)(333)(334)(335)(336)(337)(338).

1.6.1. Células Tumorales Circulantes (CTC)

Los estudios con CTC en pacientes con CCC se caracterizan por el empleo de métodos diferentes entre unos y otros, con muestras pequeñas, lo que dificulta la comparación y la extracción de conclusiones. Asimismo, la mayor parte se han limitado al recuento de CTC para emplearlas como herramienta pronóstica, siendo muy reducido el número de estudios que han buscado su caracterización molecular.

Una mayoría de estudios han empleado métodos de detección basados en inmunoafinidad, con enriquecimiento positivo o negativo según cada caso. Sin embargo, también se vienen comunicando un número creciente de estudios con métodos de detección de CTC basados en tamaño u otras características físico-químicas (329)(339)(340)(341)(342)(343)(344)(345)(346)(347)(348)(349)(350)(351)(352)(353)(354)(187)(355)(356)(357)(358)(359)(360)(361)(362)(363)(364)(365)(366)(367)(368)(369)(370)(371)(372)(373).

Hristozova y colaboradores (349), mediante citometría de flujo, detectaron la presencia de CTCs en 18/42 (43%) pacientes con CCCLA irresecable, encontrando que la detección de CTCs se correlacionaba con la presencia de metástasis ganglionares locorregionales. Gröbe y colaboradores, empleando el sistema CellSearch, detectaron CTCs en el 12.5% de 110 pacientes con cáncer de cavidad oral que habían sido intervenidos mediante cirugía R0, hallando que la presencia de CTCs se asociaba a una SLP más corta, a una mayor T y a la presencia de metástasis locorregionales. Tinhofer y colaboradores (350), utilizando un método basado en la detección de CTCs mediante la amplificación de antígenos tumorales, detectaron CTCs previo al inicio de tratamiento adyuvante en el 29% de 144 pacientes con CCCLA reseado. La presencia de CTCs fue mayor en tumores de amígdala o base de lengua, y aunque hubo una tendencia no significativa a una mejor supervivencia libre de enfermedad (SLE) en carcinomas orofaríngeos, sí hubo una

asociación significativa entre los carcinomas no orofaríngeos y peores SLE y SG. Por último, Grisanti y colaboradores (351), utilizando el sistema CellSearch™, identificaron CTC en el 26% de 53 pacientes con CCC recurrentes o metastásicos, hallando que el punto de corte ≥ 1 CTCs se asociaba a un peor pronóstico en cuanto a SLP y SG, alcanzando una tasa de control de la enfermedad significativamente mayor en pacientes sin CTCs que con CTCs (45% vs 8%, $p=0.03$). En el estudio prospectivo CIRCUTEC, se incluyó a 65 pacientes con CECC R/M realizándose extracciones de sangre basalmente, y al 7º y 21º días de iniciar el primer ciclo de QT con el esquema EXTREME (cisplatino-5FU-cetuximab trisemanal). Se emplearon 3 sistemas de detección de CTC: CellSearch, EPISPOT y la citometría de flujo (CMF). EPISPOT, CellSearch y la CMF detectaron CTC en el 69%, 21% y 11% de los casos, respectivamente. La SLP fue significativamente más corta en los pacientes con número de CTC estable o en aumento entre la determinación basal y a los 7 días con EPISPOT (3.9 vs 6.2 m; 95% IC 5-6.9, $p=0.0103$), y lo mismo ocurrió en los pacientes con CTC ≥ 1 con EPISPOT o con CellSearch ($p=0.03$), con EPISPOT o CMF ($p=0.048$), y CellSearch o CMF en el día 7 ($p=0.0005$). Este estudio sugiere, por tanto, que las CTC pueden emplearse para monitorizar la respuesta temprana a la quimioterapia en el CCC R/M (354).

En una cohorte prospectiva de 113 pacientes con CECC LA, se empleó el sistema CellSearch para la determinación de CTCs basalmente, tras 2 ciclos de QT de inducción y al final del tratamiento con QT-RT. Se detectó la sobreexpresión de PD-L1 en las CTC en el 25.5%, 23.5% y 22.2% de los pacientes en cada una de los momentos descritos, respectivamente. Los pacientes con CTCs con sobreexpresión de PD-L1 al final del tratamiento de QT-RT tuvieron una peor SLP ($p<0.001$) y SG ($p<0.001$), y fue un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante. Los autores, proponen que las CTC PDL1+ podrían servir para identificar una población de pacientes que se podrían beneficiar del tratamiento adyuvante con inhibidores de checkpoint dirigidos contra el eje PD1-PDL1 (187). En esta misma línea, Chikamatsu y colaboradores (355), aislaron CTCs de 30 pacientes con CECC R/M por depleción negativa de células leucocitarias mediante partículas magnéticas y la identificación de las CTCs por la expresión de mRNA de varios marcadores epiteliales (CK19, EpCAM, EGFR, c-MET). Además se analizó la expresión en CTCs de PD-L1, PD-L2 y CD47. Se detectaron CTCs positivas para la expresión de al menos 1 marcador epitelial en 24 casos (80%), y de estos, la expresión

de CD47, PD-L1 y PD-L2 ocurrió en el 79.2%, 83.3% y 70.8%, respectivamente. No hubo correlación entre la expresión de PD-L1 en el tumor y en las CTCs. En un paciente con carcinoma epidermoide de laringe metastásico, Kulasinghe y colaboradores (356), demostraron la detección de “clusters” de CTC mediante un sistema microfluído en espiral, que tras su tinción con anticuerpos específicos demostraron expresar PD-L1. Este mismo grupo comparó el sistema CellSearch con otros dos sistemas de detección no basados en inmunoafinidad, el sistema ScreenCell y el RosetteSep en pacientes con CECC. Se detectaron CTC en el 18.6% (8/43), 46.4% (13/28) y 64% (16/25) de los casos, respectivamente, demostraron que los dos métodos no basados en IA, detectaban CTC en un mayor número de casos que CellSearch (357).

Morgan y colaboradores (363), emplearon una tecnología de espectroscopia novedosa, utilizada en el desarrollo de tecnología espacial, y conocida como nanotecnología de tipo Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). Como antígeno de captura se empleó el EGF (epidermal growth factor, por sus siglas en inglés). En primer lugar se aislaron las CTCs de baja densidad y los leucocitos mediante centrifugación de gradiente de densidad, y luego se incubaron con nanopartículas SERS-EGF, siendo posteriormente iluminados con un láser de 785 nm. El número de CTCs se pudo determinar en función de la intensidad de señal SERS. Con este sistema el número de CTCs detectado en 82 pacientes con CECC LA, fue considerablemente más alto que con otras tecnologías, estableciéndose 675 CTCs como el mejor punto de corte para predecir la supervivencia libre de metástasis a distancia (SLMD) a 1, 2 y 5 años.

En un meta-análisis publicado en 2017, que incluyó un total de 17 estudios con CTCs en pacientes con CECC, se concluyó que la presencia de CTCs se asocia de manera estadísticamente significativa con una pobre SG (HR 2.8, IC 95% 1.34-5.86), SLE (HR 3.86, IC 95% 2.03-7.36) y SLP (HR 3.31, IC 95% 1.71-6.42). Además los pacientes con CTCs tienden a recaer más, a presentar metástasis ganglionares locoregionales y una categoría T más avanzada (364).

El PREDICT-HN (NCT03491176) es un estudio en curso en pacientes con CECC que vayan a recibir tratamiento con QT-RT con intención radical, y que realizará estudios de imagen mediante RMN semanal y extracciones de sangre también semanales para estudio de CTCs por el sistema CellSearch y de ADNtc. El objetivo principal es evaluar el valor de la

cinética de respuesta del tumor y de las CTCs para predecir la respuesta al tratamiento (365). En la **Tabla 10** se resumen los estudios más relevantes con CTC en pacientes con CECC.

Tabla 10. Estudios más relevantes con CTC en pacientes con CECC VPH-no relacionado.

Autor	Sistema de detección de CTC	n (pacientes)	n (muestras)	Tasa de detección de CTC	Valor pronóstico
Wirtshafter (2002) (339)	CellSearch	18 CECC estadios I-IV	18	44% (0-3 CTC)	-
Partridge (2003) (340)	IA con enriquecimiento negativo	36 CECC estadios I-IV	36	50% (0-5 CTC)	Peor SLE
Guney (2007) (341)	CellSearch	21 CECC LA	21	33%	-
Winter (2009) (342)	ISSET (tamaño)	16 CECC (348)	32 (pre- y post-cirugía)	63%	-
Jatana (2010) (343)	IA con enriquecimiento negativo	48 CECC estadios I-IV	61	71%	Peor SLE
Buglione (2012) (344)	CellSearch	73 CECC estadios I-IV	41 (pre- y post-tratamiento)	15% (0-43 CTC)	Descenso de CTC → mejor respuesta
Nichols (2012) (345)	CellSearch	15 CECC LA	15	40%	Peor SG en CTC+
Bozec (2013) (346)	CellSearch	49 CECC LA 10 CS	49 CECC LA 10 CS	16% CECC 0% en N- 23% en N1-2c 0% CS	-
He (2013) (347)	CellSearch	9 CECC estadios III-IV	9	33% (0-1 CTC)	-
Hsieh (2015) (348)	IA con enriquecimiento negativo	53 CECC LA ó R/M	53	19%	-
Hristozova (2011) (349)	Citometría de flujo	42 CECC LA irresecable	42	43%	Asociación de CTC+ con N+
Gröbe (2013) (374)	CellSearch	110 CECC resecado R0 (CO)	110	-	Asociación de CTC+ con N+ y < SLP
Tinhofer (2014) (350)	IA mediante amplificación de antígenos tumorales	144 CECC resecado	144	29%	Asociación de CTC+ con < SLE y SG
Grisanti (2014) (351)	CellSearch	53 CECC R/M	53	26%	Asociación de CTC+ con < TCE, SLP, y SG
Inhesten (2015) (352)	Citometría de flujo	40 CECC II-IV	120 (antes, durante y después de tratamiento)	97% (80% básalmente)	Asociación de CTC con < SLE y SG
Dyavanagoudar (2008)	Detección de CK19 por RT-PCR	25 CECC (cavidad oral)	25	16%	-
Kusukawa (2000) (353)	Detección de CK19 por RT-PCR	20 CECC (cavidad oral)	20	10%	-
Garrel (2019) (354)	CellSearch, EPISPOT, Citometría de flujo	65 CECC R/M	Extracciones basal, d7 y d21 del 1er ciclo de EXTREME	EPISPOT: 69%, CellSearch: 21% CMF: 11%	Asociación de estabilidad/incremento de nº CTC con EPISPOT ó CTC+ con CellSearch con < SLP
Strati (2017) (187)	CellSearch	113 CECC LA	Extracciones basal, tras 2	Sobreexpresión PDL1 en CTC en 25.5% (basal),	Asociación de CTC PDL1+ post-QTRT con < SLP y SG

			ciclos QTi y tras QT-RT	23.5% (post 2º QTi) y 22.2% (post-QTRT)	
Chikamatsu (2019)(355)	Enriquecimiento negativo y expresión mRNA de marcadores epiteliales (CK19, EpCAM, EGFR, c-MET)	30 CECC R/M	30	CTC con expresión de ≥ 1 marcador epitelial: 80%	-
Kulasinghe (2017)(356)	Sistema de microfluído en espiral	1 CECC R/M	1	Detección de "clusters" de CTC con expresión de PDL1	-
Kulasinghe (2016)(357)	IA vs NIA: CellSearch (IA) vs ScreenCell (NIA) vs RosetteSep (NIA)	43	43	CellSearch: 18.6% (8/43) ScreenCell: 46.4% (13/28) RosetteSep 64% (16/25)	-
Liao (2019)(358)	IA con enriquecimiento negativo	20 CECC LA ó R/M	20	Detección CTC con fenotipo epitelial (E-CTC) en 75% y CTC con fenotipo mesenquimal (M-CTC) en 90%	Asociación de M-CTC con > probabilidad metástasis a distancia y < SLP
Zheng (2019)(359)	CytoSorter (IA + sistema de microfluído)	20 CECC LA, 6 LTb y 12 CS	Pre- y post-QTi	CS: 0% CTC+ CECC: 77% CTC+	Asociación de CTC con N+, con RP vs RC y con < SLE
Chang (2019)(360)	IA con enriquecimiento negativo	34 CECC R/M	34	-	< SLP y SG a > nº CTC
Wang (2019)(361)	IA con enriquecimiento negativo	53 CECC LA	Antes y entre 2ª y 4ª semana de QT-RT	-	Asociación de reducción de nº CTC con > SLP y SG
Kawada (2017)(362)	CellSieve (Sistema de microfiltración a baja presión)	32 CECC	32	90.6%	> nº de CTC a > estadio
Onidani (2019)(329)	LFIMA (sistema de microfluído y detección por inercia) vs ADNtc	9	9	Mutaciones en CTC en 4/9 pts y en 1/9 pts en ADNtc	-
Morgan (2019)(363)	SERS (espectroscopia tipo RAMAN)	82 CECC LA	82	-	Asociación de > nº CTC con SLMD
Sun (2017)(364)	Meta-análisis 17 estudios CTC en CECC	-	-	-	Asociación de CTC con estadio más avanzado y < SLP, < SG

CECC: carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, CK19: citoqueratina 19, CO: cavidad oral, CS: controles sanos, CTC: células tumorales circulantes, IA: método de detección por inmutafinidad, LA: enfermedad localmente avanzada, n: número, N: ganglios cervicales locoregionales, R/M: fase recurrente y/o metastásica, RT-PCR: PCR en tiempo real, SLE: supervivencia libre de enfermedad, SLP: supervivencia libre de progresión, SG: supervivencia global, TCE: tiempo de control de la enfermedad, VPH: virus del papiloma humano.

Por último, algunos trabajos han estudiado el papel de las CTCs en pacientes con una entidad menos frecuente en nuestro medio, como el carcinoma de nasofaringe (CN) (366)(367)(368)(369)(370)(371)(372)(373)(375)(376)(377). En la **Tabla 11** se resumen los estudios más relevantes con CTC en pacientes con CN.

Tabla 11. Estudios más relevantes con CTC en pacientes con CN VEB+.

Autor	Sistema de detección de CTC	n (pacientes)	n (muestras)	Tasa de detección de CTC	Valor pronóstico
Zhang (2018)(366)	SE-iFISH	50 CN II-IV	Basal y post QT	92%	> recuento de CTC a > estadio AJCC Recuento de CTC se correlacionó con la respuesta Aneuploidia Cr 8 en CTC se asoció a eficacia de la QT en CN
Zhang (2018)(366)	ISET	33 CN estadios I-IV	33	66.7%	Buena correlación de CTC con carga viral VEB
Si (2016)(367)	CanPatrol™ (método de detección por tamaño) Estudio de ADN de VEB por qPCR	81 CN estadios I-IV	81	Detección CTC: 96.6% 3 fenotipos: híbrido > expresión de proteínas VEB, mesenquimal > expresión MMP-9	Mayor recuento CTC correlaciona con N+ y M1
You (2019)(368)	CTC vs ADNtc-VEB	148 CN R/M 122 CN L/LA	Basal y post QT	M0: 19/122 (16%) M1: 64/148 (43.2%)	CTC y ADN-VEB tiene valor pronóstico que aumenta al combinarse entre ellos y con pruebas de imagen
Li (2018)(369)	CTC y expresión de COX-2 en CTC	131 CN L/LA	Basal y post-QTRT	66.4% CTC COX2+ basal 46.1% CTC COX2+ post-QTRT	< expresión de COX-2 post QT-RT Peor pronóstico de la expresión de COX-2 en CTC post QT-RT.
Vo (2016)(370)	CTC (Microsieve) vs ADNtc-VEB (qPCR y dPCR)	46 CN	Basal y post-QTRT	ADNtc-VEB: qPCR BamHi-W 89%, qPCR EBNA1 69%, dPCR EBNA1 85%	Mejor correlación de estadio clínico, respuesta radiológica y SG con ADNtc-VEB que con recuento de CTC
He (2017)(371)	ISET + IHQ CK5/CK6/P36 ISET + ISH EBERs	33 CN	Basal	CTC: 66.7% CTM: 6.1%	Correlación entre recuento de CTC y títulos de EBV VCA-IgA y ADNtc-VEB
Fu (2017)(372)	Detección de ARNm-hTERT libre en plasma y en CTC	33 CN 24 CS	Basal y post-QTRT	-	Asociación de nivel de ARNm-hTERT en plasma y CTC con estadio clínico y respuesta al tratamiento
Wen (2019)(376)	Tecnología de enriquecimiento CanPatrol	60 CN 18 CS	Basal y post-QTi	CTC+: 86.7% CTCmesenq+: 50%	Reducción del recuento de CTC con el tratamiento con QTi CTCmesenq+ peor Px
Sun (2019)(375)	CellSpoter Analyzer vs ADNtc VEB (RT-PCR)	M0: 114 M1: 136	Basal	Mediana CTC: M0: 9.3 M1: 12.5	Recuento de CTC y niveles de LMP1, BART y EBER1 > en M1 vs M0
Ou (2019)(373)	CellSearch	370 CN estadios III y IV	Basal	M0: 77/288 (27%) M1: 16/81 (20%)	Peor pronóstico a > n° de CTC Combinación de CTC y ADNtc-VEB mejor valor pronóstico
Xie XQ (2019)(377)	CanPatrol™ + HIS (COX-2) vs ADNtc VEB (RT-qPCR)	50 CN II-IV 10 CS	50 CN 10 CS	CTC+: 96% M-CTC+: 76%	> recuento de CTC, M-CTC+ y COX2-CTC+ más frecuente en estadio IV y con ADNtc-VEB+

ADNtc: ADN tumoral circulante, AJCC: American Joint Committee on Cancer, ARNm: ARN mensajero, CK: citoqueratina, CN: carcinoma de nasofaringe, Cr: cromosoma, CS: controles sanos, CTC: células tumorales circulantes, EBERs: EBER1 y EBER2 son ARNs no codificantes del VEB, ISET: Isolation by Size of Tumor Cells, SE-iFISH: subtraction enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization, L/LA: fase localizada/localmente avanzada, n: número, M0: estadio no metastásico, M1: estadio metastásico, Mesenq: mesenquimal, N: ganglios cervicales locoregionales, qPCR: PCR cuantitativa, QT: quimioterapia, QTi: quimioterapia de inducción, QTRT: quimioradioterapia, R/M: fase recurrente/ metastásica, RT-PCR: PCR en tiempo real, VEB: virus de Epstein Barr.

1.6.2. ADN Tumoral Circulante (ADNtc)

Como se explicó en la introducción a esta sección de biopsia líquida en CCC, debido a la compleja biología de esta entidad y a su menor prevalencia en comparación con otros tipos de cáncer, son pocos los estudios llevados a cabo con ADNtc. A continuación se discuten los más relevantes y en las **Tablas 11, 12 y 13** se exponen estos y algunos más.

1.6.2.1. ADNtc en CECC VPH-no relacionado

Empleando espectrometría cuantitativa se estudió el ADNtc en 121 pacientes con CECC de cavidad oral, y en 50 controles sanos. El nivel de ADNtc fue significativamente más alto en los pacientes con CECC que en los controles, y se correlacionó con el tamaño tumoral, la presencia de metástasis ganglionares regionales y con estadios más avanzados (378). Perdomo y colaboradores (379), estudiaron mediante NGS mutaciones en ADNtc en 5 genes (TP53, NOTCH1, CDKN2A, CASP8, PTEN) en 36 pacientes con CECC en estadios II-IV. En el 42% de los casos se detectaron mutaciones en el ADNtc, correspondiendo el 67% de estos a pacientes en estadios I y II. Se detectaron un total de 18 mutaciones coincidentes entre el plasma y el tumor primario. En otra serie de 37 pacientes con CECC en estadios III y IV, se realizó la secuenciación completa de TP53 en muestras de tumor, plasma y de enjuagues orales, así como en 49 controles sanos. Se detectaron 36 mutaciones en TP53 en tumor, 3 en plasma y 26 en enjuagues orales. En el 67% se detectó al menos una mutación en TP53 en tumor. La concordancia de las mutaciones en TP53 entre el tumor, los enjuagues orales (11%) y el plasma (2.7%) fue baja. La proporción de casos positivos en enjuagues orales fue mayor en tumores de cavidad oral u orofaringe, que en tumores de laringe (**Tabla 12**).

Tabla 12. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CECC VPH-no relacionado.

Autor	n	Escenario	Tecnología	Tasa de detección	Especificidad	Conclusiones
Lin (2018)(378)	121 CECC (CO) 50 CS	LA	PCR digital	-	-	Nivel de ADNtc mayor en CECC que en CS Asociación de > nivel ADNtc con > tamaño tumoral y con N+ Reducción de nivel de ADNtc en 75% de casos tras la resección quirúrgica
Van Ginkel (2017)(380)	6 CECC	LA	PCR digital	100%	100%	Detección de mutaciones en el 100% de los casos
Egyud (2019)(381)	8 CECC	LA	NGS	6/8	-	Recaída en 4/8 pacientes, en 2 de ellos ADNtc detectable antes de recaída
Perdomo (2017)(379)	36 CECC PLASMA	LA	NGS (TP53, NOTCH1, CDKN2A, CASP8, PTEN)	18/36 (67%) (estadios I y II)	-	Detección de 18 mutaciones coincidentes entre plasma y tumor primario
Perdomo (2017)(379)	37 CECC PLASMA/ENJAGUES ORALES	LA	NGS (TP53)	3/37	-	Baja concordancia de mutaciones en TP53 entre el tumor 1º, el plasma y enjuagues orales
Fostira (2019)(382)	54 CECC LA 15 CECC R/M	LA & R/M	SAFESEQ (TP53, CDKN2A, PIK3CA, HRAS)	LA: 51% R/M: 93%	-	-Elevada concordancia tejido-plasma, especialmente en R/M -Detecta emergencia de nuevas mutaciones durante el tratamiento / PD

ADNtc: ADN tumoral circulante, CECC: carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, CO: cavidad oral, CS: controles sanos, LA: enfermedad localmente avanzada, n: número, NGS: secuenciación masiva, R/M: fase recurrente y/o metastásica, RT-PCR: PCR en tiempo real, PD: progresión.

1.6.2.2. ADNtc en CECC VPH-relacionado

Existen varios estudios recientes que demuestran la utilidad del estudio mediante ADNtc de secuencias específicas del virus del papiloma humano (VPH). La mayoría de estudios se han realizado en la enfermedad no avanzada, bien sea localizada o localmente avanzada, con tasas de detección de ADNtc en plasma de entre el 65% y el 96%, con especificidades también elevadas, en su mayoría entre el 89% y el 100% (383)(384)(385)(386)(387)(388).

Ahn y colaboradores (387), demostraron, en 52 pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe VPH+, que la detección del ADN del VPH en plasma o en saliva tras finalizar el tratamiento con quimio-radioterapia concomitante, se asoció a un elevado valor predictivo positivo, de tal manera que aquellos pacientes ADNtc-VPH+ en plasma o en saliva tenían una supervivencia libre de recaída (SLR) y una supervivencia global (SG) significativamente más cortas que los pacientes ADNtc-VPH- en saliva y plasma. En otro estudio realizado en 21 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello VPH+

y VPH-, se estudiaron, secuencias del ADN del VPH y mutaciones somáticas frecuentes en el cáncer de cabeza y cuello en plasma y en saliva (388). El estudio en saliva detectó alteraciones en ADNtc en el 100% de los cánceres de cavidad oral (CO), 47% de los cánceres de orofaringe, 70% de los cánceres de laringe y 67% de los cánceres de hipofaringe, mientras que en el plasma las tasas de detección en estas sublocalizaciones fueron del 80%, 91%, 86% y 100%, respectivamente. Sin embargo, cuando se combinó la combinación de la detección en plasma o saliva, la detección de alteraciones moleculares en ADNtc ocurrió en el 100% de los casos de cáncer de CO, el 91% de los cánceres de orofaringe, y en el 100% de los cánceres de laringe e hipofaringe (**Tabla 13**).

Tabla 13. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CECC VPH+.

Autor	n	Escenario	Tecnología	Tasa de detección	Especificidad	Conclusiones
Damerla (2019) (383)	97 CECC (OF) VPH+ 6 CECC VPH- 20 CS	Localizado	PCR digital	95.6%	100%	ADNtc detecta ADN de VPH16 y 33 con misma fiabilidad que en tejido ADNtc VPH también detectable en tumores pequeños
Chera (2019) (384)	103 CECC	Localizado	PCR digital	89%	97%	0% de pts con >95% de aclaramiento de ADNtc recayeron 35% de pts con <95% de aclaramiento ADNtc recayeron ADNtc debería explorarse como marcador para estrategias de deintensificación en VPH+
Mazurek (2016) (389)	200 CECC (VPH+ y VPH-)	Localizado	RT-PCR (amplificación de TERT y HPV16 y HPV18)	14% VPH+ en plasma	-	> cantidad de ADNtc en OF vs otras localizaciones > cantidad de ADNtc a > estadio = cantidad ADNtc en VPH+ y VPH-
Wang (2015) (388)	93 CECC	Localizado	VPH+: PCR digital (E6 y E7), PCR multiplex (E6 y E7) VPH-: NGS (TP53, PIK3CA, CDKN2A, FBXW7, HRAS, NRAS)	L/LA: 10/10 (100%) R/M: 37/39 (95%) Saliva: CO (100%), OL (47-70%) Plasma: CO (80%), OL (86%)	-	Alta tasa de detección en saliva y plasma Detección de ADNtc en 3/3 casos que recayeron y en 0/5 casos que no recayeron
Dahlstrom (2015) (385)	262	Localizado (I-IV)	RT-PCR	60.5%	67%	ADNtc VPH basal asociado con estadio global y N ADNtc VPH basal no predictor de recaída
Cao (2012) (386)	40 VPH+ 24 VPH- 10 CS	Localizado	RT-PCR	65%	-	Negativización ADN VPH tras la RT en 14 pts seriados Ascenso ADN VPH en 3 pts en recaída metastásica
Ahn (2014) (387)	93 plasma y saliva pre- y post-tto (81 VPH+ y 12 VPH-)	Localizado	RT-PCR	67%	89%	SG reducida en pts con ADNtc VPH post-tto en plasma o saliva

ADNtc: ADN tumoral circulante, CECC: carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, CS: controles sanos, L: enfermedad localizada, LA: enfermedad localmente avanzada, n: número, N: ganglios cervicales locoregionales, NGS: secuenciación masiva, OF: orofaringe, OL: otras localizaciones, R/M: fase recurrente y/o metastásica, RT-PCR: PCR en tiempo real, SLE: supervivencia libre de enfermedad, SLP: supervivencia libre de progresión, SG: supervivencia global, TCE: tiempo de control de la enfermedad, VPH: virus del papiloma humano.

1.6.2.3. ADNtc en CN VEB+

El estudio mediante ADN libre circulante en plasma del VEB en el CN se inició hace ya más de una década. Son por tanto, numerosos los trabajos que han conseguido demostrar la utilidad del estudio del ADNtc de regiones concretas del VEB en el plasma de los pacientes con CN, tanto como herramienta pronóstica que permite refinar el estadiaje mediante el sistema TNM, al igual que como variable que permite identificar a los pacientes que se beneficiarían de un tratamiento más intensivo con quimioterapia de inducción seguida de QTRT radical en lugar de QTRT radical sola (390)(391)(392)(393)(394)(395)(396)(397). Incluso se ha empleado en el cribado del CN en población endémica. En un estudio llevado a cabo en Hong-Kong se estudió a 20349 personas, identificando a 309 con niveles detectables de ADNtc-VEB en plasma iniciando un programa de cribado dirigido mediante nasofibroscopia y resonancia magnética nuclear (RMN) permitiendo diagnosticar a 34 pacientes con CN, la mayoría de ellos en fases tempranas (estadios I y II AJCC 7ª Ed) y alcanzando una tasa de supervivencia que se comparó favorablemente con el global de pacientes diagnosticados en el año 2013 en el mismo área, la mayoría en estadios III y IV (AJCC 7ª Ed) (398). Véase **Tabla 14**. Nuestro grupo, publicó recientemente la evolución de dos casos de pacientes con CN metastásico que, tras progresar al tratamiento con inmunoterapia con el agente anti-PD1 nivolumab, fueron rescatados con platino-gemcitabina semanal y trisemanal, respectivamente, y donde la determinación del ADN del VEB en plasma se correlacionó con la respuesta radiológica a la QT, demostrando su utilidad en la monitorización de la enfermedad avanzada (399).

Tabla 14. Estudios más relevantes con ADNtc en pacientes con CN VEB+.

Autor	n	Escenario	Tecnología	Tasa de detección	Conclusiones
Chen (2018)(390)	385	CN estadio II	RT-qPCR	161/385 (41.8%)	Nivel de ADNtc y volumen tumoral permite discriminar entre el CN estadio II de buen y mal Px
Zhang (2015)(391)	1467	CN estadio I-IVB	RT-qPCR	-	Nivel de ADNtc complementa el TNM clasificando en buen y mal Px
Guo (2019)(392)	1529	CN estadio I-IVA	RT-qPCR	-	Nivel de ADNtc complementa el TNM clasificando en buen y mal Px
Lee (2019)(393)	518	CN estadio I-IVA	RT-PCR	Mediana ADNtc VEB basal: 588 copias/ml	Nivel de ADNtc complementa el TNM 8ª Ed mejorando clasificación Px
Liu (2015)(396)	185	CN estadio III-IVA	RT-qPCR	Pre-QTi: 89% Post-QTi:31%	ADNtc positivo tras QTi se asocia a un peor Px
Xu (2019)(394)	2692	CN estadio III-IVA	RT-qPCR	Pre-QTi ADNtc VEB \geq 2000 copias/ml: 57.5%	Niveles altos de ADNtc VEB pre-QTi identifican a grupo de mal Px que se beneficia de la QTi
Huang (2019)(395)	278	CN estadio III-IV	RT-qPCR	Pre-QTi mediana ADNtc VEB: 9035 copias/ml Post-QTi: 23.7%	Niveles altos de ADNtc VEB post-QTi se asocian a peor Px
Zhang (2018)(397)	4482	CN estadio III-IVB	RT-qPCR	Mediana ADNtc VEB basal: 3740 copias/ml	Niveles altos de ADNtc VEB pre-QTi identifican a grupo de mal Px que se beneficia de la QTi
Chan (2017)(398)	20349 (cribado)→ 309 ADNtc VEB +	CN estadio I-IVB	RT-qPCR	Cribado: 309/20349 (5.5%)	Cribado en población endémica permitió aumentar % de casos detectados en fase precoz (I-II), asociándose a mejor supervivencia que población global con CN en el mismo área endémica
Cabezas-Camarero (2020)(399)	2	CN estadio IVB	RT-qPCR	100%	Niveles de ADNtc-VEB se asociaron a la respuesta a la QT post-IO

CN: carcinoma de nasofaringe, CS: controles sanos, LA: enfermedad localmente avanzada, n: número, NGS: secuenciación masiva, Px: pronóstico, R/M: fase recurrente y/o metastásica, QTi: quimioterapia de inducción, RT-PCR: PCR en tiempo real, VEB: virus de Epstein Barr.

2. HIPÓTESIS

“los gálatas pretenden que sus minas...son las mejores. Pero las de Turdetania son mucho más famosas”

Estrabón.

Geografía de Iberia. “Bética: Riqueza minera de Turdetania”

“...la hipótesis es...un instrumento lógico, sin el cual ni la observación misma, con ser de suyo tan pasiva, puede realizarse. Buena o mala, una conjetura, un intento de explicación cualquiera, será siempre nuestro guía, pues nadie busca sin plan”

Santiago Ramón y Cajal.

Los tónicos de la voluntad: Reglas y consejos sobre investigación científica.

HIPÓTESIS

IsoFlux™ detecta un número mayor de CTC que la tecnología estándar y es capaz de recuperar las CTC para su análisis mutacional mediante diferentes técnicas de secuenciación.

3. OBJETIVOS

“Todo lo que este libro pretende hacer es, pues, narrar la historia...de modo que la atención quede fijada en ciertos problemas que creo interesantes e importantes, sin olvidar cuánto queda por hacer para que podamos afirmar con seguridad que hemos llegado a las soluciones”

John H. Elliott

La España Imperial 1469 - 1716

3.1. OBJETIVOS PRINCIPALES:

- a)** Descripción y análisis de la asociación de diferentes variables clínicas con la supervivencia en los pacientes con CCRm vírgenes de tratamiento para la enfermedad avanzada.
- b)** Comparar la eficacia en la enumeración de CTC de CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes con CCRm vírgenes de tratamiento para la enfermedad avanzada.
- c)** Establecer el mejor punto de corte de CTC para predecir la supervivencia con cada sistema de detección.
- d)** Estudiar la asociación entre el valor del recuento de CTC y sus puntos de corte con las características clínicas de los pacientes con CCRm vírgenes de tratamiento para la enfermedad avanzada.
- e)** Estudiar la capacidad de detección y recuento de CTC con IsoFlux™ en pacientes con CCC de histología epidermoide y no epidermoide.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- a)** Estudiar la proporción de pacientes evaluados con IsoFlux™ en que se detectaron ≥ 4 CTC / 7,5 ml de sangre (el límite de detección (LOD por sus siglas en inglés)) propuesto para estudios genéticos con castPCR™ en pacientes con CCRm.
- b)** Estudiar la viabilidad del empleo de 4 métodos diferentes basados en PCR para el análisis mutacional de RAS así como su concordancia en CTC recuperadas con IsoFlux™ (cobas®, CLART®, castPCR™ y BEAMing) en pacientes con CCRm.
- c)** Estudiar la concordancia del análisis mutacional de KRAS entre el tumor sólido y las CTC mediante castPCR™.
- d)** Estudiar la concordancia del análisis mutacional de RAS mediante tecnología estándar (Idylla) en el tumor sólido y mediante BEAMing en ADN libre circulante en plasma y ADN de CTC en pacientes con CCRm.
- e)** Estudiar la capacidad de recuperación de CTC de IsoFlux™ y la viabilidad de su análisis mutacional mediante PCR digital y NGS (secuenciación masiva).

4. PACIENTES Y MÉTODOS

“La razón por la que las células HeLa eran tan preciosas era porque permitía a los científicos realizar experimentos que habrían sido imposibles con seres humanos vivos”

“Enviar células vivas por correo no se hacía en aquel momento. Gey las enviaba por vía aérea en tubos con unas gotas de medio de cultivo, el suficiente para mantenerlas con vida durante un corto periodo de tiempo. A veces los pilotos o los auxiliares de vuelo se guardaban los tubos en los bolsillos de la camisa, para mantener las células a temperatura corporal como si aún estuvieran en una incubadora”

Rebecca Skloot

Muerte y vida del cultivo celular

La vida inmortal de Henrietta Lacks

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este fue un proyecto prospectivo y multicéntrico, realizado en 5 hospitales españoles (**Tabla 15**). El estudio se compuso de 3 partes diferenciadas, pero con un nexo común: la detección, enumeración y recuperación de CTC con el sistema IsoFlux. A continuación se describen las diferentes partes del estudio:

- Comparación de la capacidad de detección y recuento de CTC de los sistemas CellSearch e IsoFlux, en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV).
- Evaluación de diferentes métodos de análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con el sistema IsoFlux en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV) y correlación con tumor primario y el plasma.
- Evaluación de la capacidad de detección y recuento de CTC con el sistema IsoFlux y viabilidad de su caracterización molecular en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente o metastásica (R/M).

Tabla 15. *Hospitales participantes en el estudio.*

Hospital	Comunidad Autónoma
Hospital Clínico Universitario San Carlos	Madrid
Hospital Universitario Puerta de Hierro	Madrid
Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba	Andalucía
Hospital Universitario Infanta Cristina de Parla	Madrid
Hospital Universitario Infanta Leonor	Madrid

4.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este trabajo de tesis expone resultados de 4 proyectos de investigación, todos ellos aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario San Carlos (13/198-E, 15/364-E_BS, 16/227-E_BS, 17/030-E). En dos de estos proyectos participaron otros centros, siendo cada proyecto aprobado por el respectivo CEIC de cada centro colaborador.

Todos los pacientes firmaron el Consentimiento Informado antes de ser incluidos en cualquiera de los 4 proyectos resumidos en esta Tesis Doctoral.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo de acuerdo a Ley 14/2007 de 3 de Julio, de Investigación Biomédica. Dado que este trabajo de Tesis Doctoral se inició en 2013 y finalizó en 2019, los datos clínicos, anátomo-patológicos y moleculares obtenidos se manejaron de acuerdo a lo establecido en la Ley vigente en cada momento, esto es, la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y a partir de 2018 en base a los principios del Reglamento General de Protección de Datos (RGPD) europeo (Reglamento (UE) 2016/679) y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

4.3. FINANCIACIÓN

Los 4 proyectos de investigación que se resumen en esta Tesis Doctoral, pudieron llevarse a cabo gracias a una ayuda no competitiva de Merck KGaA, y al Proyecto de Investigación en Salud PI16/01773 del Instituto de Salud Carlos III.

Los reactivos para la detección y recuperación de CTC en el grupo de pacientes con cáncer de cabeza y cuello fueron generosamente suministrados por Fluxion Biosciences, Inc., South San Francisco, CA, USA.

4.4. DESCRIPCIÓN DE CADA PARTE DEL ESTUDIO

4.4.1. Parte 1: Comparación de la capacidad de detección y recuento de CTC de los sistemas CellSearch e IsoFlux, en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV) (Véanse Tabla 16 y Figura 9 más abajo)

Esta parte del estudio se llevó a cabo sólo en el grupo 1.

- **Grupo 1:** pacientes con CCR avanzado (CRCav), vírgenes de tratamiento o quimio-naïve (QT-naïve) para la enfermedad avanzada, en los cuales se extrajo sangre para CTC antes de comenzar la quimioterapia. La detección y recuento de CTC se realizó con CellSearch® e IsoFlux™ (Véase Tabla 16 más abajo).

4.4.2. Parte 2: Evaluación de diferentes métodos de análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con el sistema IsoFlux en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV) y correlación con tumor primario y el plasma (Véanse Tabla 16 y Figura 9 más abajo).

Esta parte del estudio se llevó a cabo en los grupos 1, 2 y 3 tal como se describe a continuación:

- **Grupo 1:** pacientes con CCR avanzado (CRCav), vírgenes de tratamiento o quimio-naïve (QT-naïve) para la enfermedad avanzada, en los cuales se extrajo sangre para CTC antes de comenzar la quimioterapia (Véase Tabla 16 más abajo).
 - La recuperación de CTC para el análisis mutacional de KRAS se realizó con IsoFlux™.
 - Se realizó el análisis mutacional de KRAS en ADN de CTC con distintos métodos: RT-PCR (Cobas4800, TheraScreen), PCR multiplex (CLART mPCR) y castPCR.
 - El análisis mutacional de KRAS en la muestra del tumor sólido se realizó mediante tecnología estándar (Cobas4800 ó TheraScreen) y mediante castPCR.
 - No se estudió NRAS ni en tumor sólido ni en CTC ya que no era práctica habitual en el momento del diseño del estudio (año 2013).
- **Grupo 2:** pacientes con CCRav KRAS nativo (KRAS^{NAT}) en progresión a QT para la enfermedad avanzada. La sangre para CTC se extrajo en el momento de la progresión

radiológica antes de comenzar una nueva línea de tratamiento. **(Véase Tabla 16 más abajo).**

- El recuento de CTC se realizó exclusivamente con el sistema CellSearch.
 - La recuperación de CTC para el análisis mutacional de KRAS se realizó con IsoFlux™.
 - Se realizó el análisis mutacional de KRAS en ADN de CTC con distintos métodos: RT-PCR (Cobas, TheraScreen), PCR multiplex (CLART mPCR) y castPCR.
 - El análisis mutacional de KRAS en la muestra del tumor sólido se realizó mediante tecnología estándar (Cobas ó TheraScreen) y mediante castPCR.
 - No se estudió NRAS ni en tumor sólido ni en CTC ya que no era práctica habitual en el momento del diseño del estudio (año 2013).
- **Grupo 3:** pacientes con CCRav, QT-naïve para la enfermedad avanzada, en los cuales se extrajo sangre para el recuento y recuperación de CTC y para ADN libre circulante en plasma antes de comenzar la quimioterapia **(Véase Tabla 16 más abajo).**
 - El recuento y recuperación de CTC se realizó exclusivamente con IsoFlux™.
 - El análisis mutacional de RAS en la muestra del tumor sólido se realizó mediante RT-PCR estándar (Idylla, Biocartis, Bélgica).
 - El análisis mutacional de RAS en CTC y en plasma se realizó mediante tecnología BEAMing.

4.4.3. Parte 3: Evaluación de la capacidad de detección y recuento de CTC con el sistema IsoFlux y viabilidad de su caracterización molecular en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente o metastásica (R/M) (Véanse Tabla 16 y Figura 9 más abajo).

Esta parte del estudio se llevó a cabo en el grupo 4 tal como se describe a continuación:

Grupo 4: pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente y/o metastásica (R/M) de histología epidermoide o no, que hubieran recibido o no tratamiento para la fase R/M **(Véase Tabla 16 más abajo).**

- El recuento y recuperación de CTC se realizó exclusivamente con IsoFlux™
- El análisis mutacional en ADN de CTC y en plasma se realizó con distintos métodos según el tipo de tumor: PCR digital y Secuenciación masiva (NGS).

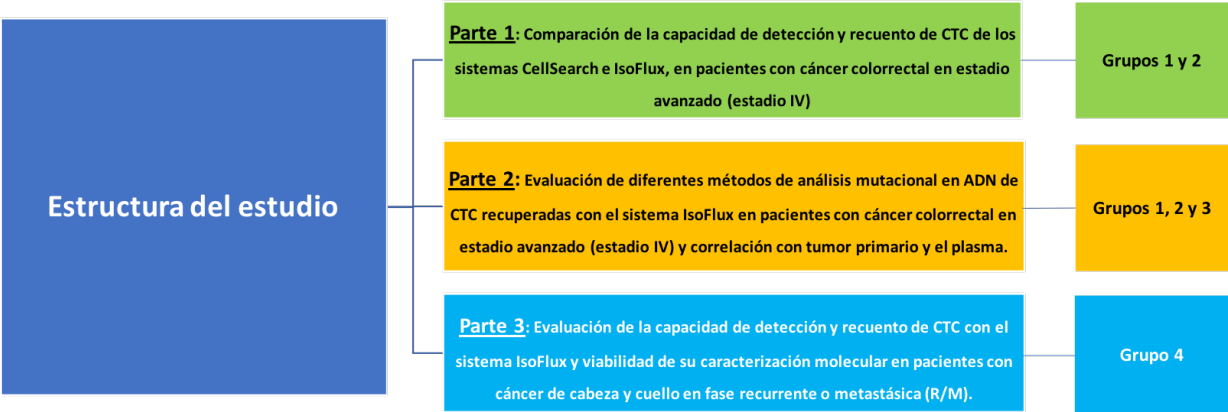


Figura 9. Estructura del estudio y título/descripción de cada una de las 3 partes que lo conforman.

Tabla 16. Características y análisis realizados en cada grupo de pacientes y correspondencia con cada una de las partes del estudio (para esto último véase código de colores).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Tipo de cáncer y estadio	CCR IV	CCR IV	CCR IV	CCC R/M
Histología	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide Adenocarcinoma Carcinoma indiferenciado
N	34	22	29	14
Recuento de CTC	SÍ (CellSearch & IsoFlux)	SÍ (CellSearch & IsoFlux)	SÍ (IsoFlux)	SÍ (IsoFlux)
Estudio valor pronóstico CTC	SÍ	NO	NO	NO
Caracterización molecular CTC	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Estudio de ADNtc	NO	NO	SÍ	SÍ
Técnica caracterización molecular CTC +/- ADNtc	RT-PCR mPCR castPCR	RT-PCR mPCR castPCR	BEAMing	PCR digital NGS

PARTE 1
PARTE 2
PARTE 3

ADNtc: ADN tumoral circulante, CCC R/M: cáncer de cabeza y cuello en estadio recurrente/metastático; CCR IV: cáncer colorrectal en estadio IV; RT-PCR: PCR en tiempo real; mPCR: PCR múltiplex, castPCR: competitive allele specific TaqMan PCR, BEAMing: Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics, NGS: secuenciación masiva

4.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

4.5.1. Parte 1 y Parte 2 (pacientes de los grupos 1, 2 y 3) (Ver Secciones 4.4.1 y 4.4.2.):

- Edad > 18 años
- Adenocarcinoma de colon o recto confirmado histológicamente
- No haber sido diagnosticado de cáncer en los 5 años previos, con la excepción de carcinoma basocelular de la piel o carcinoma in situ de cérvix
- Todos los pacientes debieron haber firmado el correspondiente Consentimiento Informado para poder participar en el estudio.
- En los pacientes del **grupo 1 (Ver definición en sección 4.4.1.):**
 - No haber recibido quimioterapia para la enfermedad avanzada
 - Estar en condiciones de recibir quimioterapia en 1ª línea para la enfermedad avanzada
 - El estatus de KRAS (exones 2, 3 y 4) en el tumor primario podía ser mutado o no mutado (nativo).
- En los pacientes del **grupo 2 (Ver definición en sección 4.4.2.):**
 - Debían estar en progresión a ≥ 1 línea con agentes anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) para la enfermedad avanzada
 - El estatus de KRAS (exones 2, 3 y 4) en el tumor primario tenía que ser nativo.
- En los pacientes del **grupo 3 (Ver definición en sección 4.4.2.):**
 - No haber recibido quimioterapia para la enfermedad avanzada
 - Estar en condiciones de recibir quimioterapia en 1ª línea para la enfermedad avanzada
 - El estatus de RAS (KRAS y NRAS) en el tumor primario podía ser mutado o no mutado (nativo).

4.5.2. Parte 3 (Pacientes del grupo 4; Ver Sección 4.4.3.):

- Edad > 18 años
- Cáncer de cabeza y cuello de histología epidermoide y no epidermoide confirmado histológicamente

- Encontrarse en la fase recurrente y/o metastásica del cáncer de cabeza y cuello.
- No haber sido diagnosticado de cáncer en los 5 años previos, con la excepción de carcinoma basocelular de la piel o carcinoma in situ de cérvix.
- Todos los pacientes debieron haber firmado el correspondiente Consentimiento Informado para poder participar en el estudio.

4.6. MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.6.1. Muestras de tumor en parafina

Se emplearon 4-8 cortes de 4- 5 μ m cada uno de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) de la muestra del tumor primario. Mediante un proceso de desparafinación se extrajo el ADN según se explica más adelante. El análisis de RAS en el contexto asistencial se realizó en cada institución participante. En el Hospital Clínico San Carlos se recibieron los cortes procedentes del Servicio de Anatomía Patológica para llevar la extracción de ADN y posterior análisis mutacional en el laboratorio de Oncología Molecular del Servicio de Oncología Médica. A continuación se detallan el tipo de estudios a realizar en cada muestra de tumor sólido según el grupo de estudio:

- **Grupo 1 (Ver definición en sección 4.4.1.).**
 - Se realizaron cortes de parafina de la muestra del tumor sólido para el estudio mutacional de KRAS con tecnología estándar (Cobas4800, TheraScreen) y con castPCR.
- **Grupo 2 (Ver definición en sección 4.4.2.).**
 - Se realizaron cortes de parafina de la muestra del tumor sólido para el estudio mutacional de KRAS con tecnología estándar (Cobas, TheraScreen) y con castPCR.
- **Grupo 3 (Ver definición en sección 4.4.2.).**
 - Se realizaron cortes de parafina de la muestra del tumor sólido para el estudio mutacional de RAS con tecnología estándar (Idylla).

- **Grupo 4 (Ver definición en sección 4.4.3.).**
 - Se realizaron cortes de parafina de la muestra del tumor sólido para el estudio mutacional por PCR digital en los casos con mutaciones en “hot spots” detectadas en plasma o en CTC.

4.6.2. Muestras de sangre periférica

El procesamiento de las muestras se centralizó en la **Unidad de Células Tumorales Circulantes** y en el **Laboratorio de Oncología Molecular** ambos pertenecientes al **Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid**.

A continuación se detallan el tipo y cantidad de **muestras empleadas en cada grupo** de pacientes:

- **Grupo 1:** pacientes con CCR avanzado (CRCav), vírgenes de tratamiento (quimio-naïve (QT-naïve)) para la enfermedad avanzada, en los cuales se extrajo sangre para CTC antes de comenzar la quimioterapia.
 - Se extrajeron de cada paciente 3 tubos con 7.5 ml de sangre periférica cada uno:
 - 1 tubo CellSave Preservative Tube (Menarini Silicon Biosystems, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica para el recuento de CTC por CellSearch®
 - 1 tubo EDTA BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica para el recuento de CTC por IsoFlux™
 - 1 tubo EDTA BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica para la recuperación de CTC por IsoFlux™ para posteriormente realizar análisis mutacionales.
- **Grupo 2:** pacientes con CCRav KRAS nativo (KRAS^{NAT}) en progresión a QT para la enfermedad avanzada. La sangre para CTC se extrajo en el momento de la progresión radiológica antes de comenzar una nueva línea de tratamiento.
 - Se extrajeron de cada paciente 2 tubos con 7.5 ml de sangre periférica cada uno:

- 1 tubo CellSave Preservative Tube (Menarini Silicon Biosystems, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica para el recuento de CTC por CellSearch®
 - 1 tubo EDTA BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica para la recuperación de CTC por IsoFlux™ para posteriormente realizar análisis mutacionales.
- **Grupo 3:** pacientes con CCR avanzado (CRCav), vírgenes de tratamiento (quimio-naïve (QT-naïve)) para la enfermedad avanzada, en los cuales se extrajo sangre para el estudio de CTC antes de comenzar la quimioterapia.
 - Se extrajeron de cada paciente 3 tubos Cell-Free DNA BCT® (Streck, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica cada uno:
 - 1 tubo Cell-Free DNA BCT® con 7.5 ml de sangre periférica para el recuento de CTC por IsoFlux™
 - 1 tubo Cell-Free DNA BCT® con 7.5 ml de sangre periférica para la recuperación de CTC por IsoFlux™ para posteriormente realizar el análisis mutacional de RAS por BEAMing.
 - 1 tubo Cell-Free DNA BCT® con 7.5 ml de sangre periférica para el análisis mutacional de RAS por BEAMing en ADN libre de plasma.
- **Grupo 4:** pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente y/o metastásica (R/M) de histología epidermoide o no, que hubieran recibido o no tratamiento para la fase R/M.
 - Se extrajeron de cada paciente 3 tubos EDTA BD Vacutainer® (Becton Dickinson, Inc.) con 7.5 ml de sangre periférica cada uno:
 - 1 tubo EDTA BD Vacutainer® con 7.5 ml de sangre periférica para el recuento de CTC por IsoFlux™
 - 1 tubo EDTA BD Vacutainer® con 7.5 ml de sangre periférica para la recuperación de CTC por IsoFlux™ para posteriormente realizar el análisis mutacional por PCR digital o secuenciación masiva (NGS).

- 1 tubo EDTA BD Vacutainer® con 7.5 ml de sangre periférica para el análisis mutacional por PCR digital o secuenciación masiva (NGS) en ADN libre de plasma.

4.6.3. Líneas celulares KRAS nativa y KRAS mutada

Se emplearon concentraciones diferentes de ADN extraído de células de la línea KRAS mutada (KRAS^{MUT}) (G13D) de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA, USA) y de la línea celular de cáncer de próstata KRAS nativa (KRAS^{NAT}) PC3 (ATCC, Manassas, VA, USA), con el fin de testar la capacidad de detección de la mutación por BEAMing en ADN de CTC. Se emplearon diferentes mezclas de células KRAS^{MUT} con células KRAS^{NAT}. Se realizaron estudios de “spiking” empleando CTC de la línea celular KRAS^{MUT} MDA-MB-231 en sangre de controles sanos. Las CTC fueron recuperadas con IsoFlux™ y posteriormente purificadas con CellCelector™, quedando únicamente celularidad KRAS mutada en la muestra resultante.

4.7. AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE CTC

4.7.1. Aislamiento y enumeración de CTC con CellSearch®

Para la identificación y enumeración de CTC con CellSearch®, se utilizó el dispositivo Celltracks Autoprep® (Jansenn Diagnostics, LLC), que enriquece la muestra de CTC de manera automatizada. El sistema mezcla la muestra de sangre con los reactivos del CellSearch CTC Kit (Menarini Silicon Biosystems, Inc.) que permite el análisis de hasta 16 muestras por kit. El dispositivo mezcla la sangre con 6 ml de solución tamponada, y la centrifuga a 800 x g durante 10 minutos para posteriormente aspirar el plasma y la capa de solución tamponada. A continuación el sistema añade las partículas magnéticas marcadas con anticuerpos anti-EpCAM. Tras su incubación y la separación magnética siguiente, las células no unidas y el plasma sobrante son aspirados. Los reactivos para la tinción de las células son añadidos a continuación, marcándose con anticuerpos fluorescentes dirigidos contra citoqueratinas (CK8, 18 y 19), y frente al 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), un anticuerpo anti-CD45. A continuación, el Sistema Celltracks Analyzer II (Menarini Silicon Biosystems, Inc.) escanea automáticamente toda la

superficie del cartucho, adquiere imágenes y las muestra en formato galería para su clasificación final. Tras la obtención de las imágenes por el dispositivo dos expertos diferentes identificaron como CTC aquellas cuyas características morfológicas fueron consistentes con las de una célula tumoral y que presentaban el fenotipo EpCAM +, CK +, DAPI + y CD45- (**Figura 10**) (199).

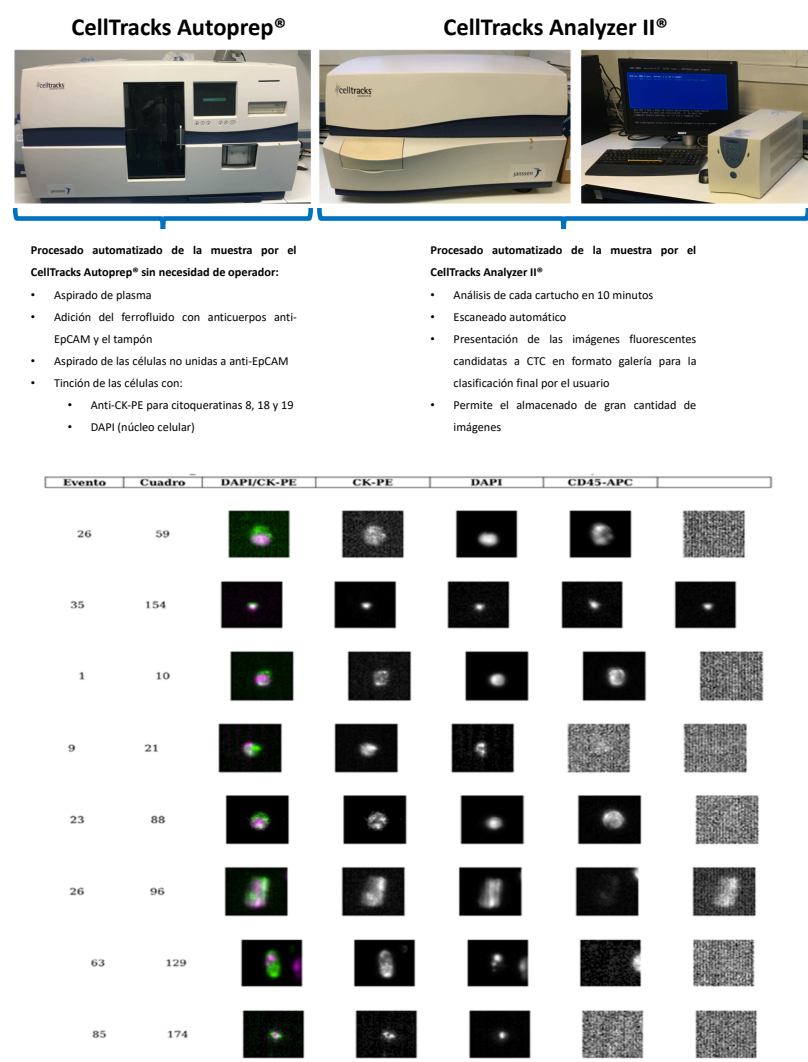


Figura 10. Componentes del sistema CellSearch®. Este sistema de enriquecimiento, detección y recuento de CTC se compone de dos dispositivos, el CellTracks Autoprep® que procesa la muestra de sangre desde su extracción hasta el último paso en que se tincionan las CTC, y el CellTracks Analyzer II®, que escanea las células, las identifica y las presenta en una galería de imágenes para su clasificación final por el usuario (Imagen de fotogalería cedida por Dra. De la Orden García y elaboración propia).

4.7.2. Aislamiento, enumeración y recuperación de CTC con IsoFlux™

- **Funcionamiento de IsoFlux™**

El cartucho o placa de procesamiento del sistema IsoFlux™ consta de tres depósitos o reservorios conectados a un canal de microfluído en el suelo del dispositivo (**Figura 2**). La muestra es cargada y luego fluye a través de la “zona de aislamiento” donde las células diana son recolectadas. El resto del componente celular “no diana” se deposita en una “zona de deshecho”. Una vez que la muestra ha pasado a través del canal de microfluído, se introduce un tampón de lavado en el pocillo de deshecho. La “zona de aislamiento” se extiende por encima del canal de flujo principal. La muestra recorre esta zona a velocidades reducidas, mientras es expuesta a un campo magnético aplicado desde la parte de arriba del canal. Las células diana y las partículas magnéticas son atraídas al techo de la “zona de aislamiento”, mientras que las células no diana continúan hasta la “zona de deshecho”. El techo de la “zona de aislamiento” está compuesto por un disco de polímero formando una estructura separada del canal de flujo principal. Al finalizar el procesamiento de la muestra, el disco se desacopla del canal de flujo principal junto con el imán, manteniendo las células diana unidas al mismo. Una vez el imán es retirado, las células diana pueden ser recuperadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf®, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) mediante pipeteo.

El sistema IsoFlux™ dispone de una bandeja de carga para los cartuchos con sus respectivas muestras -el sistema permite el procesamiento de hasta 4 muestras en paralelo- y de una pantalla táctil incorporada desde la que se controla el aparato. El flujo por el sistema de microfluído se controla aplicando una presión suministrada externamente al sistema de microfluído pero desde el interior del dispositivo. Una bomba de diafragma y un regulador electroneumático crean una presión operativa controlada de 2 psi. Esta presión se distribuye hasta los depósitos o reservorios donde se colocan las muestras para iniciar el recorrido a través del canal de microfluído. La presión se aplica y se retira de forma alterna empleando válvulas solenoides bajo control de un microprocesador y software integrados (**Figuras 11**) (181).

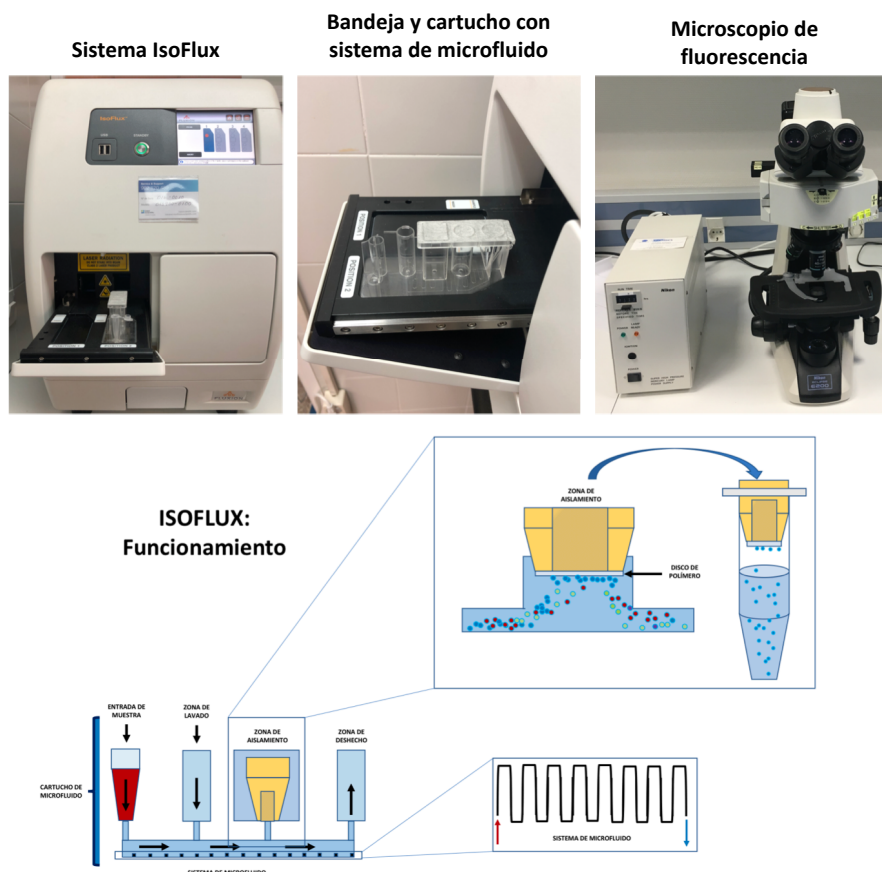


Figura 11. Componentes y mecanismo de funcionamiento del sistema IsoFlux™. Este sistema de enriquecimiento, detección, recuento y recuperación de CTC se compone de 3 elementos fundamentales: el dispositivo IsoFlux™ (1), que aplica y controla de manera automatizada la presión aplicada sobre el cartucho con el sistema de microfluído (2), consiguiendo que la muestra avance y las CTC unidas a partículas inmunomagnéticas sean aisladas al entrar en contacto con un campo magnético generado por un imán que forma parte del dispositivo IsoFlux™. Una vez aisladas, las CTC pueden ser visualizadas con un microscopio de fluorescencia (3) para su correcta clasificación por el usuario, o también pueden ser recuperadas para su caracterización molecular, si bien en este último casos no podrá realizarse su visualización y recuento. En la parte inferior de la figura se explica el funcionamiento del sistema de microfluído de cada cartucho y cómo las partículas inmunomagnéticas unidas a las CTC se adhieren al disco de polímero ante la atracción generada en la zona de aislamiento por el imán incorporado en el dispositivo IsoFlux™. El sistema IsoFlux™ procesa cada muestra en < 45 minutos y puede pudiendo procesar hasta 4 muestras simultáneamente (1 muestra por cartucho). CTC: células tumorales circulantes. (Figura de elaboración propia basada en ficha técnica de IsoFlux).

• Aislamiento y enumeración de CTC con IsoFlux™

Se utilizaron 1 ó 2 tubos EDTA (Grupos 1, 2 y 4) o Streck (Grupo 3) para el enriquecimiento de CTC con Isoflux, cada uno con 7.5 ml de sangre periférica, dependiendo de si se iba a realizar recuento de CTC solamente (1 tubo) o recuento y caracterización molecular de CTC (2 tubos). Las muestras de sangre fueron procesadas en las primeras 36 horas desde su extracción.

Para recuperar la fracción mononuclear de la sangre las muestras de sangre se procesaron empleando columnas LeucoSep (Greiner Bio-One, Monroe, NC), a los que se

añadieron 15 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). La fracción mononuclear se recuperó y resuspendió en 1 ml de tampón de unión (CTC Enrichment Kit; Fluxion Biosciences Inc.).

Las partículas inmunomagnéticas preconjugadas con anticuerpos anti-EpCAM (Grupos 1,2,3 y 4) (CTC Enrichment Kit, Fluxion Biosciences, CA, USA) o, simultáneamente, con anticuerpos anti-EpCAM y anticuerpos anti-EGFR (Grupo 4) (Enhanced CTC Enrichment Kit, Fluxion Biosciences, CA, USA), se añadieron directamente a la muestra y se incubaron durante 2 horas a 4°C para su mezcla pasiva mediante inclinación y rotación lentas. La porción celular de la sangre mezclada con las partículas inmunomagnéticas se cargó en el cartucho de microfluído y se procesó con el equipo IsoFlux. Las muestras se pasaron por el canal de microfluído a una velocidad de 20 µl/min aplicando una presión de 2 psi desde el extremo proximal del canal. Cada muestra completó el recorrido por el canal de microfluído en < 45 minutos. Al final de este recorrido, el disco de polímero que contiene las CTC en una gota suspendida del mismo se insertó en un tubo adaptado de 1.5 ml, y las CTC fueron recuperadas mediante pipeteo y fijadas en un portaobjetos estándar para su visualización con reactivos fluorescentes. Estos incluyeron el isotiocianato anti-CK-fluoresceína (FITC) específico para citoqueratina, el anticuerpo anti-CD45 específico para leucocitos y el Hoechst 33342, que tiñe el núcleo celular (CTC Enumeration Kit; Fluxion Biosciences Inc.). La muestra fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia por dos expertos. Las células se clasificaron como CTC si eran CK+, CD45-, nucleadas y se encontraban morfológicamente intactas. Las imágenes se realizaron con un microscopio de fluorescencia por cortesía de Izasa Scientific (WerfenLife, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).

- **Recuperación de CTC con IsoFlux™ para su caracterización molecular**

Un segundo tubo con 7.5 ml de sangre periférica, fue procesado para la recuperación de las CTC, para así poder llevar a cabo su caracterización molecular. Este 2º tubo no fue empleado para el recuento de CTC, ya que no pueden realizarse simultáneamente el recuento y la recuperación de CTC en una misma muestra. La muestra de este segundo tubo se procesa de manera similar a como se procesa para llevar a cabo el recuento de CTC, con 2 excepciones:

- No se lleva a cabo la fijación y tinción de la muestra de las CTC. Para su recuperación, las CTC fueron obtenidas del disco de polímero mediante pipeteo y liberadas en un

tubo de microcentrífuga con 10-15 µl de PBS. El sedimento celular obtenido tras extraer el PBS fue congelado a -80°C hasta su procesamiento para el análisis mutacional (181).

- Se empleó el IsoFlux CTC NGS Prep Kit para procesar la muestra de CTC obtenida tras su enriquecimiento y recuperación con IsoFlux. Este kit se compone de unas columnas con reactivos para amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés) y permite incrementar la pureza del contenido de ADN tumoral de la muestra entre un 5% y un 25%. El kit incluye todos los reactivos para el enriquecimiento, lisis y amplificación genómica y es capaz de generar suficiente ADN para lanzar varias carreras de secuenciación masiva (NGS) o con PCR digital) (400).

4.7.3. Purificación de las CTC recuperadas con IsoFlux™ mediante el sistema CellCelector™

- **Resumen del mecanismo de funcionamiento de CellCelector™**

El sistema CellCelector™ resulta de la combinación de una plataforma automatizada de citometría de alta resolución con la micromanipulación automatizada de células empleando un microcapilar de cristal de alta precisión fijado a un brazo robótico capaz de manejar volúmenes en el rango del nanolitro.

Tras el escaneado de la muestra bien sea en un campo iluminado, con contraste de fases y/o con hasta 7 canales fluorescentes se continua mediante la identificación automatizada, selección y detección de las células en base a marcadores positivos y negativos y a su morfología. Las CTC se recuperan en un vial específico para su análisis molecular o incluso su cultivo. El sistema permite recuperar las células agrupadas o de manera individual. Gracias a sus precisos movimientos, el sistema CellCelector™ puede manipular muestras de células prácticamente en cualquier soporte: células obtenidas por métodos de enriquecimiento (Ej: IsoFlux) o de CTC fijadas, obtener células directamente de secciones de tejido, o incluso manipular células vivas. El sistema CellCelector™ puede procesar cualquier muestra enriquecida en CTC, independientemente de cual haya sido el método de enriquecimiento utilizado y trabajar en presencia de grandes cantidades de células contaminantes. CellCelector™ se ha empleado con éxito en muestras enriquecidas por métodos inmunomagnéticos

(CellSearch®, IsoFlux™, Illumina MagSweeper™, Dynal® MPC-S, RosetteSep CD45), métodos de separación por gradiente de densidad o por tamaño (Parsortix™). Para obtener una resolución máxima con CellCelector™ (aislamiento de célula única) en muestras previamente enriquecidas con métodos inmunomagnéticos (Ej: IsoFlux™), se puede emplear el dispositivo MagnetPick™ (ALS GmbH, Jena, Alemania), que aplica un campo magnético sobre las células con partículas inmunomagnéticas adheridas y previamente depositadas sobre un portaobjetos, consiguiendo así inmovilizarlas. Otra opción, en lugar de emplear el MagnetPick™, es la de emplear una matriz de nanopocillos compuesta por hasta 85.000 pocillos de 50 x 50 x 50 µm. El número y tamaño de los pocillos se puede ajustar para facilitar la captura de CTC únicas o de grupos de CTC (“clusters”). La muestra pre-enriquecida se carga en la matriz y se escanea en campo claro y por fluorescencia. De forma automática el software detecta e identifica las células y cuantifica la fluorescencia. Tras este primer paso, el usuario puede seleccionar las células candidatas a ser recuperadas. Las células no se quedan fijadas a los nanopocillos, pudiendo ser recuperadas con un 100% de eficiencia.

El sistema permite la identificación y selección de múltiples tipos celulares de manera automatizada, empleando para ello un microscopio invertido automático para campo claro y para fluorescencia (cuenta con hasta 7 canales de fluorescencia siendo compatible con la mayoría de fluoróforos disponibles en el mercado), y equipado con objetivos de 10x y 40x. La visualización automática consta de una primera fase de escaneado rápido a 10x y una segunda fase de alta resolución para su validación.

El proceso de recuperación de CTC es rápido y preciso para evitar el daño celular. Así cada célula pasa < 10 segundos en el capilar y toda la fase de recuperación dura unos 20 segundos. A modo de ejemplo, una muestra de 10 CTC mezcladas entre 50.000 células contaminantes pueden ser recuperadas mediante el sistema CellCelector™ en menos de 5 minutos si se deposita cada CTC en un pocillo individual, y la mitad de tiempo si se depositan todas en un mismo pocillo, y todo esto incluye todo el proceso de visualización y obtención de imágenes de manera automatizada. Otros métodos emplean sistemas de vacío o la disección con laser para la recuperación celular, pudiendo así dañar las células por traumatismo físico. Por el contrario, el sistema CellCelector™ procesa las células evitando el menor daño que condicione su viabilidad,

permitiendo así el aislamiento de células vivas y cualquier tipo de caracterización molecular compleja, incluso en célula única (401).

- **Procesamiento de las muestras con CellCelector™**

Para el análisis mutacional con BEAMing de la línea celular KRAS mutada en experimentos de “spike in” empleando diferentes cantidades de estas células en sangre periférica de controles sanos, se empleó primero el sistema IsoFlux™ para el enriquecimiento de las CTC. Dado el abundante componente celular no tumoral que se suele obtener con los diferentes sistemas de enriquecimiento, incluido IsoFlux™, se purificó la muestra mediante el sistema CellCelector™, que extrae el componente celular no tumoral alcanzando una pureza en la muestra de CTC cercana al 100% (401). Brevemente, tras el enriquecimiento de la muestra por IsoFlux™, esta se cargó en una matriz de nanopocillos para su procesamiento con el sistema CellCelector™. El escaneado automático de la muestra con el CellCelector™ permitió la identificación y selección de las CTC en base a características de inmunofluorescencia y tamaño, permitiendo así su recuperación con una pureza cercana al 100%, para posteriormente proceder a su caracterización molecular (**Figura 12**) (401).



Figura 12. Elementos del sistema CellCelector™ empleado para la purificación de la muestra de CTC recuperadas con IsoFlux™. (Elaborada a partir de la publicación de Nelep y Eberhardt (401)).

4.8. OBTENCIÓN DE PLASMA DE SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre periférica para el análisis por BEAMing en los pacientes del grupo 3 se recogieron en tubos Streck Cell-Free DNA BCT®, que permiten la preservación del ADN durante un período más largo que el resto de tubos de recogida, facilitando así la recepción de la muestra en el laboratorio del Hospital Clínico San Carlos (402).

Las muestras de sangre periférica para el análisis por PCR digital y NGS en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Grupo 4), todos ellos reclutados en el Hospital Clínico San Carlos, se realizó en tubos EDTA BD Vacutainer®.

La separación del plasma se realizó mediante dos centrifugaciones seriadas:

- Primera centrifugación de la sangre 10 minutos, a 1600 x g, a temperatura ambiente, para separar la fracción celular y el plasma.
- Segunda centrifugación del plasma 10 minutos, a 6000 x g, a temperatura ambiente para eliminar residuos de células sanguíneas.

Se verificó visualmente cada plasma, eliminando del estudio aquellos plasmas hemolizados. Los plasmas utilizados en el estudio fueron alicuotados y almacenados a -80°C hasta su utilización para la extracción de ADNlc.

4.9. EXTRACCIÓN DE ADN

4.9.1. Extracción de ADN de tumor sólido en parafina para su análisis mutacional

El ADN fue extraído de las muestras de tumor sólido embebido en parafina de forma manual, mediante el raspado de la muestra fijada en parafina previa identificación por un patólogo del área correspondiente a tumor (**Figura 13**). Se emplearon entre 4 y 8 cortes (más o menos cortes según la dimensión del área tumoral en cada caso) de 4-5 µm cada uno.

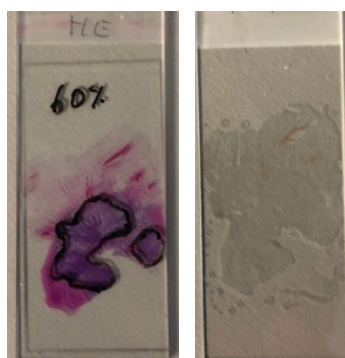


Figura 73. Portaobjetos con cortes de parafina de una muestra de cáncer de colon (izquierda: corte teñido con H&E; derecha: corte seriado de la misma zona sin teñir). El área tumoral se muestra circunscrita en negro. El porcentaje tumoral corresponde a un 60%. A la derecha se muestra el corte seriado sin teñir de la misma zona. Para la extracción de ADN tumoral, se raspó con una cuchilla el área tumoral indicada en el corte sin teñir empleando posteriormente el QIAmp DNA FFPE Tissue Kit. H&E: Hematoxilina y Eosina. (Elaboración propia).

Para la extracción de ADN de parafina se emplearon dos kit diferentes aunque en esencia muy similares y con el mismo principio de funcionamiento. Para la extracción de

ADN de parafina para su posterior análisis por Cobas[®], TheraScreen[®] o castPCR[™], se empleó el QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN). Para la extracción de ADN de parafina para su posterior análisis mutacional mediante BEAMing, PCR digital o secuenciación masiva (NGS), se empleó el GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN). Estos dos kit permiten eliminar la parafina y revertir los enlaces cruzados producidos por la formalina en el ADN, evitando así la desaminación de las bases de citosina a deoxiuracilo y la consecuente conversión C-T en las reacciones de secuenciación.

La parafina se disuelve en solución de desparafinación. Para lisar la muestra se emplea la digestión con proteinasa K. Posteriormente se incuba a 90°C para romper los enlaces de la parafina. El ADN queda separado del resto de componentes en una columna QIAmp MinElute y finalmente eluido con tampón ATE o AW1/AW2 y con etanol según el kit empleado. A continuación se centrifuga la muestra para remover el etanol residual. Finalmente se eluye el ADN pudiendo ya ser empleado en reacciones de secuenciación o ser almacenado a -20°C para su uso posterior (403).

4.9.2. Extracción de ADN de CTC para su análisis mutacional por RT-PCR, CLART PCR multiplex y castPCR.

La amplificación del genoma completo se realizó directamente en las CTC recuperado después de la lisis celular (REPLI-g UltraFast Mini Kit; Qiagen, Alemania) (404). El g-DNA amplificado se purificó y se eluyó en 50 µl de tampón AE (QIAmp DNA Micro Kit; Qiagen, Alemania) para realizar el análisis mutacional KRAS con tres métodos diferentes basados en PCR (405).

4.9.3. Extracción de ADN de CTC para su análisis mutacional por PCR digital y NGS.

La muestra de CTC recuperadas mediante IsoFlux[™] se acompaña de un importante componente de células no tumorales, en su mayoría leucocitos. La presencia de este componente celular no tumoral puede dificultar el análisis mutacional en ADN de las CTC, ya que da lugar a la existencia de grandes cantidades de ADN de origen no tumoral y por tanto no mutado. Con la intención de reducir la cantidad de ADN de origen no tumoral para así facilitar el análisis mutacional de la habitualmente escasa cantidad de ADN de las CTC, se empleó el IsoFlux CTC NGS Prep Kit (Fluxion Biosciences, South San Francisco, CA, USA). Este Kit se compone de 2 tubos (**Figura 13**):

- **Tubo A (purificación):** tras el empleo de un tampón de bloqueo e incubación a Tª ambiente durante al menos 30 minutos y posterior adición de un tampón de liberación, la columna se carga con la muestra de las CTC (una sola muestra por columna) recuperadas con IsoFlux™ unidas a las micropartículas magnéticas. A continuación se incuba a Tª ambiente en un rotador durante 30 minutos (**Figura 13**).
- **Tubo B (Amplificación del genoma completo (WGA)):** se traspasa la muestra purificada del Tubo A al Tubo B y se añaden un tampón de lisis y PBS o agua libre de nucleasas y se deja incubando la columna en hielo a 4°C durante 10 minutos. Se añade una solución de “parada”. A continuación se prepara la mezcla para la reacción de amplificación que constará de los siguientes componentes: el lisado celular, tampón de la reacción, agua libre de nucleasas, ADN polimerasa. La mezcla se traspasa a un nuevo tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 ml. A continuación se incuba a 30 °C durante 10 a 16 horas. Posteriormente se incuba a 65 °C durante 3 minutos para inactivar la ADN polimerasa. Por último se lavó la muestra de sales y proteínas empleando el QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). El ADNg puede ahora ser almacenado a -80 °C y emplearse directamente para su secuenciación por NGS o PCR digital en cualquier momento (**Figura 14**).

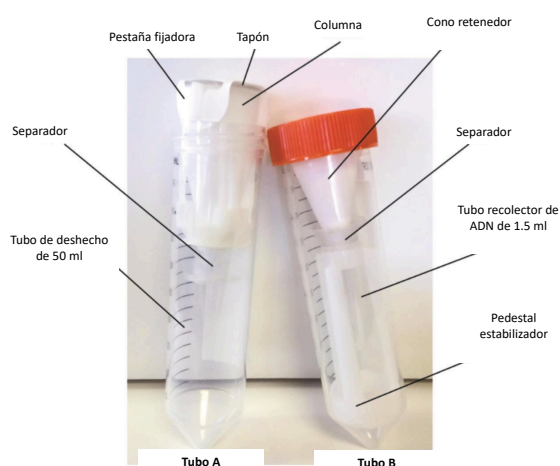


Figura 14. Elementos del IsoFlux™ NGS DNA Kit. El kit consta de 2 tubos compuestos por columnas donde se van llevar a cabo la purificación del ADN de las CTC (Tubo A) y la amplificación del ADN (Tubo B) para su posterior secuenciación bien por NGS (secuenciación masiva) o por PCR digital. Este procedimiento no es necesario cuando el análisis mutacional se realiza por castPCR, dado el mecanismo de funcionamiento de esta última, caracterizado por el bloqueo del ADN nativo o no mutado. (Ficha técnica de IsoFlux y elaboración propia).

4.9.4. Extracción de ADN de plasma para su análisis mutacional por BEAMing, PCR digital y NGS.

Se utilizó el kit “QIAamp Circulating Nucleic Acid” (QIAGEN, Alemania) realizando la extracción de ADNlc a partir de 3 ml de plasma por cada muestra, tras haber sido descongelado a temperatura ambiente. Dados los elevados volúmenes de trabajo, se emplearon columnas QIAamp Mini (QIAGEN, Alemania) con tubos de extensión sobre una bomba de vacío (QIAvac 24 Plus vacuum system; QIAGEN, Alemania). Las columnas usadas constan de una membrana a la que se unen fragmentos de ácidos nucleicos con un tamaño mayor de 20 bases (**Figura 15**).

El procedimiento de extracción consta de **4 pasos (Figura 15)**:

- **Lisis.** El ADNlc en plasma se encuentra normalmente unido a proteínas o contenido en distintos tipos de vesículas (micro y nanovesículas). El primer paso es realizar una lisis para liberar el ADN y que este pueda unirse a la columna. Las muestras son lisadas con proteinasa K y el tampón ACL a una temperatura de 60°C durante 1 hora, lo cual además sirve para inactivar DNasas y RNasas.
- **Unión del ADN a la membrana de las columnas QIAamp Mini.** Se usa el tampón ACB para ajustar las condiciones de unión del ADN a la membrana de sílice. Además, este tampón evita que proteínas y otros contaminantes que pueden afectar a los análisis posteriores se unan a la membrana. Se transfiere toda la muestra a la columna usando los tubos de extensión, y, mediante la bomba de vacío (**a una presión de -800 a -900 milibares**) se absorbe todo el volumen quedando el ADN en la membrana.
- **Lavados de la membrana.** Se realizan 3 pasos de lavados de la membrana para eliminar eficientemente todos los posibles contaminantes.
- **Elución del ADNlc.** Se realizaron dos eluciones seriadas de cada membrana, con 70 µl, resultando en un volumen final de 140 µl. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

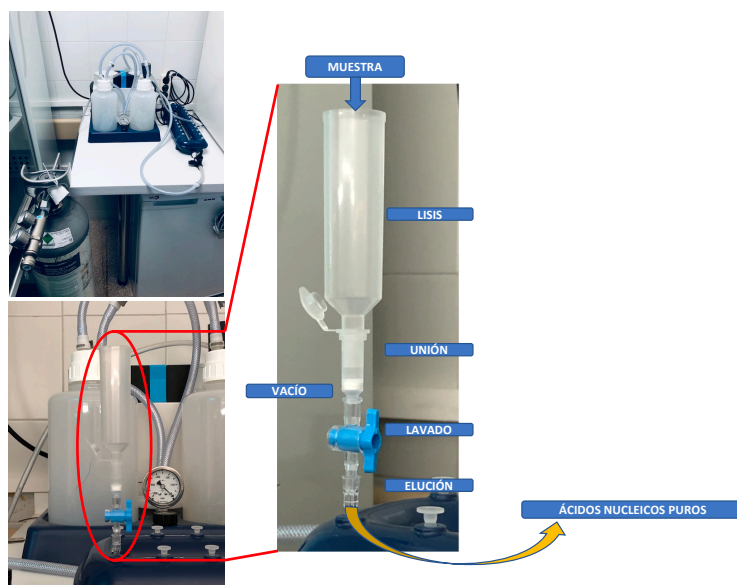


Figura 15. Elementos y pasos para la extracción de ADN libre circulante de plasma. Se muestra la bomba de vacío y se detallan la columna con el tubo de extensión, unidos a la bomba de vacío a través de una llave de paso. (Elaboración propia basada en ficha técnica de IsoFlux).

4.10. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN

4.10.1. PCR en tiempo real (RT-PCR): Cobas®, TheraScreen® e Idylla™.

- **Cobas®**

El kit Cobas® KRAS Mutation Test para usar con el sistema cobas® z 480 analyzer (Roche Molecular systems Inc.), está aprobado por la FDA para el análisis mutacional de KRAS con PCR en tiempo real de muestras de tejido detectando siete mutaciones somáticas en los codones 12 y 13 del gen KRAS (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D) https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/P140023c.pdf . En este estudio se usó para el análisis mutacional de KRAS en muestras de tumor sólido en parafina y en CTC recuperadas con el sistema IsoFlux (**Figura 16**).



Figura 16. Termociclador Veriti Dx de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), empleado para el análisis mutacional de KRAS en tumor sólido en parafina y en CTC, mediante PCR en tiempo real. CTC: células tumorales circulantes (Elaboración propia).

- **TheraScreen®**

El TheraScreen® KRAS RGQ PCR Kit detecta siete mutaciones somáticas en los codones 12 y 13 del exón 2 del gen KRAS (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D). El sistema TheraScreen® combina la tecnología ARMS (Allele refractory mutation system) y la tecnología Scorpions®. La tecnología ARMS permite la amplificación alelo-específica ya que solo amplifica de manera eficiente cuando la base 3' al final del cebador (o "primer") de la PCR se encuentra emparejada.

La tecnología Scorpions® consiste en moléculas bifuncionales que contienen un cebador de PCR unido de forma covalente a una sonda unida a un fluoróforo. Cuando la sonda se une al amplicón producido por ARMS emite fluorescencia permitiendo su detección. La ventaja de TheraScreen® frente a cobas®, está en su mayor sensibilidad y en que no solo informa de estatus mutacional de KRAS (mutado versus nativo) sino que también informa de la mutación específica que está presente (406). <https://www.qiagen.com/us/landing-pages/therascreen-kras-test-usa-subgroups/>. La reacción de PCR se realizó en el dispositivo Rotor-Gene Q MDx instrument (QIAGEN, Alemania) (**Figura 17**).



Figura 17. Equipo TheraScreen circulantes (Elaboración propia).

- **Idylla™**

La plataforma Idylla™ (Biocartis, Bélgica) permite el estudio de mutaciones en RAS de una manera sencilla y rápida, mediante el empleo de una PCR en tiempo real con apenas trabajo manual, al estar todo el proceso automatizado, no siendo necesaria la extracción del ADN de parafina como con el resto de métodos (**Figura 18**).

Para el estudio de KRAS en muestras de parafina del tumor sólido, se empleó el Idylla™ KRAS Mutation Test, que permite la detección de 21 mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 (407). Para el estudio de NRAS se empleó el NRAS-

BRAF-EGFR S492R Mutation Assay que estudia 18 mutaciones en NRAS en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 (408).

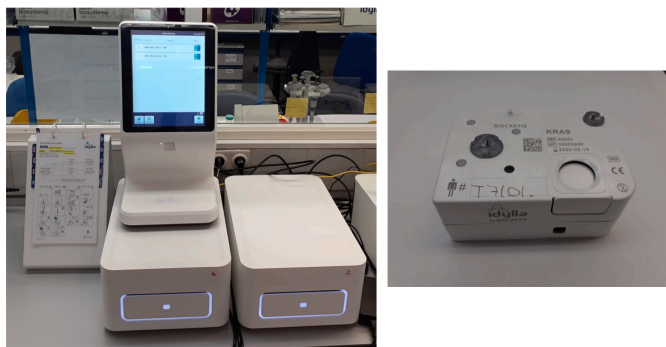


Figura 18. Sistema Idylla (Biocartis, Bélgica) para el estudio mutacional de RAS en tejido. Se muestra el dispositivo Idylla (izquierda) y el cartucho para el análisis mutacional de KRAS (derecha) (Elaboración propia).

4.10.2. PCR multiplex.

CLART® CMA multiplex PCR (GENOMICA S.A.U, Madrid, España) es una plataforma basada en microarrays de baja densidad que permite la detección múltiple de dianas en un único test. El análisis de los resultados se efectúa de forma automática a través de un software y un lector automático (CAR® o CLINICAL ARRAY READER). En este estudio, esta tecnología se utilizó para la detección e identificación en ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™ de mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 de KRAS (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D, Q61H (A> T), Q61L), utilizando el kit CLART® CMA KRAS-BRAF-PI3K (GENOMICA SAU, Madrid, España) (**Figura 19**) (408).

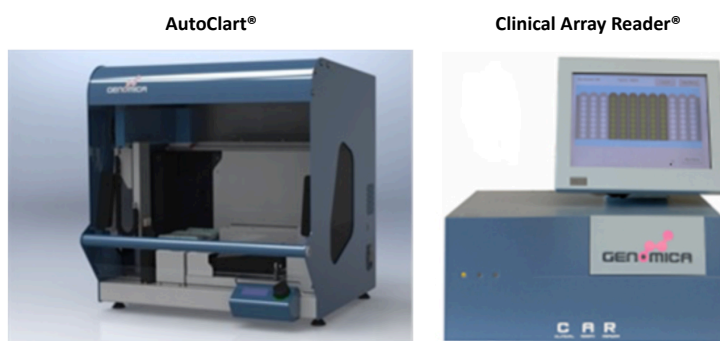


Figura 19. Elementos del sistema CLART® CMA multiplex PCR (GENOMICA S.A.U, Madrid, España). Este sistema se empleó en para el análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™. Su funcionamiento se basa en la combinación de una matriz que multiplica el número de amplificaciones por PCR que se llevan a cabo simultáneamente. La lectura de la matriz se realiza de manera automatizada mediante el Clinical Array Reader®. CTC: células tumorales circulantes (Ficha técnica del producto).

4.10.3. Competitive Allele-Specific Taqman PCR (castPCR™)

La tecnología castPCR™ se empleó para el análisis de 7 mutaciones de KRAS en las CTC y en muestras del tumor sólido en parafina de pacientes con cáncer colorrectal avanzado de los **Grupos 1 y 2**. También se empleó para el análisis mutacional de KRAS en CTC de un paciente del **Grupo 4** con adenocarcinoma de tipo intestinal de origen naso-etmoidal. La tecnología castPCR™ permite el análisis mutacional combinando una PCR cuantitativa alelo-específica con oligonucleótidos bloqueadores específicos que suprimen la amplificación no específica de alelos que no sean el que específicamente se quiere amplificar.

El análisis mutacional por castPCR™ consta de dos partes:

- **Determinación del punto de corte de detección ΔC_t :** se analizan un alelo mutado y su correspondiente gen de referencia en 3 o más muestras de ADN no mutado. Se calculan los valores del ΔC_t para cada muestra. El ΔC_t promedio de las muestras no mutadas analizadas se establece como el punto de corte de referencia para establecer la presencia de un alelo mutado.
- **Detección de la mutación:** se calcula el ΔC_t para el test del alelo mutado/secuencia de referencia y este valor se compara con el punto de corte previamente determinado. Si está por debajo del punto de corte, la muestra está mutada.

Se realizó el análisis mutacional por castPCR™ del ADN amplificado y purificado de muestras en parafina del tumor sólido y del procedente de las CTC recuperadas con el sistema IsoFlux™. Para ello se empleó el TaqMan® Mutation Detection Assay y la TaqMan® Genotyping Master Mix. Se analizaron 7 mutaciones somáticas en los codones 12 y 13 del exón del gen KRAS (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D). Las reacciones se llevaron a cabo empleando el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) (409).

4.10.4. PCR digital

- **Componentes de la PCR digital**

Se empleó la PCR digital para el análisis mutacional del tumor primario, CTC y plasma de algunos pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Grupo 4). El análisis por PCR digital se llevó a cabo con el sistema QuantStudio 3D Digital PCR System (ThermoFisher Scientific,

Waltham, MA, USA), que se compone del QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip, consistente en una matriz de 10 mm² con 20.000 pocillos, en cada uno de los cuales se producirán reacciones de PCR independientes. El sistema también cuenta con el QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader, que sirve para cargar la muestra de ADN en los chips, y con el termociclador ProFlex 2x Flat PCR System. El dispositivo QuantStudio 3D Digital PCR Instrument realiza la lectura del chip tras haber pasado por el termociclador (**Figura 20**). Los resultados aportados tras la lectura del chip son analizados con el QuantStudio 3D AnalysisSuite Software (410).

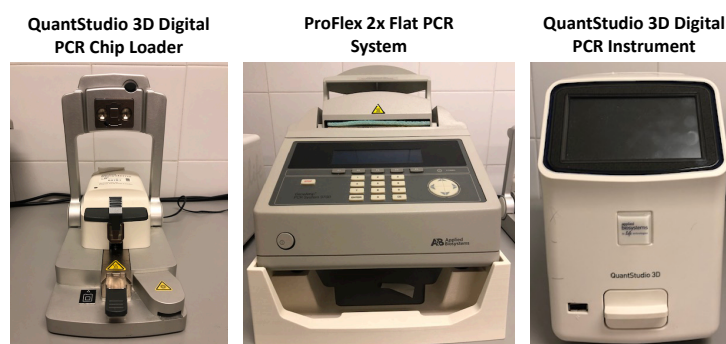


Figura 20. Elementos del QuantStudio 3D Digital PCR System (Elaboración propia).

- **Procesamiento de las muestras para su análisis por PCR digital**

Prevía extracción del ADN de cada muestra (tejido del tumor primario, ADN de plasma y ADN de CTC) tal como se ha explicado en secciones anteriores, la muestra de ADN se mezcló con una Master Mix según el protocolo del QuantStudio 3D Digital PCR System. Esta mezcla se cargó en el QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip empleando para ello el QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader. A continuación el chip, capaz de albergar 20.000 reacciones de PCR, se introdujo en el termociclador ProFlex 2x Flat PCR System empleando el programa que se resume en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Resumen del programa empleado en el termociclador ProFlex 2x Flat PCR System para la PCR digital (Elaboración propia a partir de ficha técnica de QuantStudio 3D Digital PCR System).

Etapas	Tª	Tiempo (mm:ss)	Ciclos	Velocidad	Volumen de reacción
1	96°C	10:00	x1	Estándar	20µl
2	60°C	2:00	x39		
	98°C	00:30			
3	60°C	02:00	x1		
	10°C	99:59			

Tras la PCR el chip se introdujo en el QuantStudio 3D Digital PCR Instrument para su lectura y los datos se analizaron con el QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software disponible online a través de la web de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) (411). En la **Figura 21** se resumen los pasos del protocolo para llevar a cabo el procesamiento de la muestra (410).

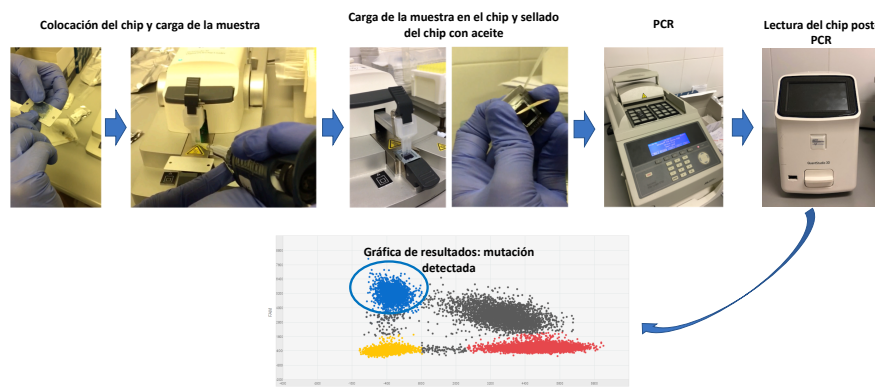


Figura 21. Etapas del procesado de la muestra en el QuantStudio 3D Digital PCR System. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado del análisis de la muestra realizado por el QuantStudio 3D AnalysisSuite Software. Los puntos azules representan la fracción mutada, en este caso para la mutación E545K de PIK3CA en un caso de adenocarcinoma de ducto salivar de parótida. (Elaboración propia).

4.10.5. BEAMing

Para el análisis de KRAS y NRAS tanto en plasma como en CTC se utilizó el Kit “OncoBEAM™ RAS CRC” que emplea la tecnología BEAMing (Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics; Sysmex) y permite el análisis de 33 mutaciones diferentes en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 tanto de KRAS como de NRAS. Además estudia la mutación V600E del gen BRAF. BEAMing es la tecnología con mayor sensibilidad en la actualidad para evaluar mutaciones recurrentes gracias a la combinación de la PCR digital con la citometría de flujo. **Con una sensibilidad de 0.01%, permite detectar en ADN extraído de plasma una molécula de ADN no mutado frente a 10,000 moléculas de ADN nativo.** Dada la elevada sensibilidad de la técnica, es necesario extremar las precauciones para evitar contaminaciones, como por ejemplo, disponer de espacios de laboratorio pre- y post-PCR claramente separados. El funcionamiento de la tecnología BEAMing consiste en:

- **Aislamiento del ADN** de la muestra biológica del paciente. El ADN extraído del tumor sólido en parafina, del plasma o de las CTC fue analizado para mediante BEAMing para las 33 mutaciones en RAS:

- **Regiones estudiadas tanto en KRAS como NRAS:**
 - Codones 12 y 13 en el exon 2 (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V, G13D).
 - Codones 59 y 61 en el exon 3 (A59T, Q61H, Q61L, Q61R)
 - Codones 117 y 146 en el exón 4 (K117N, A146T, A146V).
- **Mutaciones estudiadas sólo en NRAS:** G13R, G13V y Q61K.
- **Pre-amplificación del ADN:** se realiza mediante una PCR multiplex convencional empleando cebadores (“primers”) de las secuencia conocida de las regiones de interés (**Figura 22**).

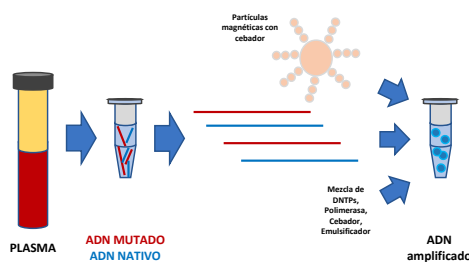


Figura 22. Aislamiento y pre-amplificación de ADN y elementos necesarios para llevar a cabo la PCR digital de emulsión (Elaboración propia a partir de ficha técnica de ONCOBEAM).

La PCR multiplex preamplifica todas las regiones de interés en un mismo tubo por muestra. En cada PCR, se evalúan hasta un máximo de 6 muestras, además de controles positivos para cada codón y controles negativos. La reacción de preamplificación se realiza por sextuplicado siguiendo un programa específico (**Figura 23**).

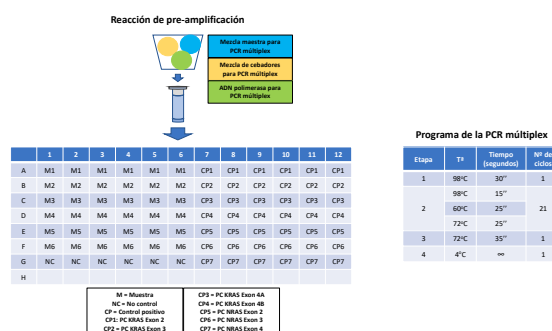


Figura 23. Primera parte de la reacción de preamplificación con la disposición de reacciones para cada pocillo de la placa (tabla izquierda) y programa de la PCR multiplex (tabla derecha) (Elaboración propia a partir de ficha técnica de ONCOBEAM).

Cuidadosamente se transfieren a una nueva placa de PCR 15 μ l de cada reacción realizada por sextuplicado. Posteriormente se realizan dos diluciones usando tampón TE (pH 8.0 y bajo contenido en EDTA) en una nueva placa de 96 pocillos. La primera dilución es 1:20. A partir de esa dilución se prepara la segunda, la cual es específica para cada codón (**Figura 24**).



- PCR de emulsión:** los fragmentos de ADN pre-amplificados se compartimentalizan en una emulsión agua-aceite con millones de gotas de agua individuales cada una compuesta por un fragmento de ADN diana y una partícula magnética (**Figura 25**). Se trata de una PCR digital de emulsión, en la que cada fragmento de ADN es amplificado empleando cebadores específicos para cada codón analizado, esferas magnéticas (con regiones de unión al ADN) y el producto de emulsión EmulsiFIRE (**Figura 26**). Mediante la emulsión se particiona la muestra, de modo que cada molécula de ADN se une a una esfera magnética y se producen las reacciones de PCR por separado.

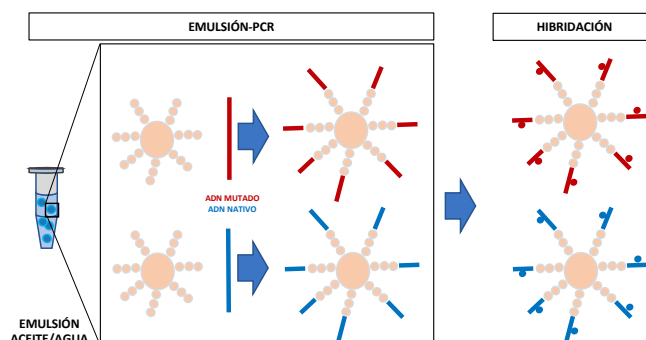


Figura 25. PCR de emulsión e Hibridación. Se muestra las partículas magnéticas unidas a fragmentos de ADN mutado (rojo) y no mutado (azul). Tras la PCR de emulsión, se produce la hibridación con sondas de fluorescencia específicas para los fragmentos mutados y no mutados (Elaboración propia a partir de ficha técnica de ONCOBEAM).

6 MUESTRAS + CONTROLES											
ME	1 rxn	EWMe_1 (KR2)	EWMe_2 (KR3)	EWMe_3 (KR4A)	EWMe_4 (KR4B)	EWMe_5 (NR2)	EWMe_6 (NR3)	EWMe_7 (NR4)			
No rxn	1	18	18	9	9	18	18	18			
EM 1-7 mcl	13.2	237.6	237.6	118.8	118.8	237.6	237.6	237.6			
Partículas (mcl)	0.8	14.4	14.4	7.2	7.2	14.4	14.4	14.4			
EmEnz (mcl)	1.0	18	18	9	9	18	18	18			
Volumen Total (mcl)	15.0	270	270	135	135	270	270	270			

EWMe: Emulsion Working Mix, EM = Emulsion Master Mix, EmEnz = Emulsion PCR DNA Polymerase, rxn = reacciones, KR = KRAS Exón, NR = NRAS Exón

Etapa	Tª	Tiempo (mm:ss)	Volver a la Etapa	Repeticiones
1	94°C	02:00		1
2	94°C	00:10		
3	68°C	00:50		3
4	70°C	01:20	2	
5	94°C	00:10		
6	65°C	00:50		3
7	70°C	01:20	5	
8	94°C	00:10		
9	62°C	00:50		3
10	70°C	01:20	8	
11	94°C	00:10		
12	59°C	00:50		50
13	70°C	01:20	11	
14	70°C	02:00		1
15	4°C	—		1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	CP1	
B	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	CP2	
C	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	CP3	
D	M4	M4	M4	M4	M4	M4	M4	M4	M4	M4	CP4	
E	M5	M5	M5	M5	M5	M5	M5	M5	M5	M5	CP5	
F	M6	M6	M6	M6	M6	M6	M6	M6	M6	M6	CP6	
G	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	CP7	
H	CP1	CP2	CP2	CP2	CP3	CP4	CP5	CP5	CP6	CP6	CP7	
Gen	KRAS	KRAS	KRAS	KRAS	KRAS	KRAS	NRAS	NRAS	NRAS	NRAS	NRAS	
Exon	Ex 2	Ex 2	Ex 3	Ex 3	Ex 4A	Ex 4B	Ex 2	Ex 2	Ex 3	Ex 3	Ex 4	
Codón	12	13	59	61	117	146	12	13	59	61	117	146

M= Muestra, CP= Control Positivo, NC= No control

Figura 26. Mezcla para las reacciones y programa de la PCR de emulsión (Elaboración propia a partir de ficha técnica de ONCOBEAM).

- **Hibridación:** Mediante el empleo de tampones específicos se produce la rotura de las burbujas de la emulsión, y se añaden sondas fluorescentes que se unen o “hibridan” con los fragmentos de ADN en las micropartículas magnéticas. Cada sonda es específica de fragmentos de ADN mutado o de ADN nativo, permitiendo así diferenciar el componente mutado del nativo (**Figura 25**).
- **Citometría de flujo:** tras lavar con PBS, las micropartículas unidas a sondas fluorescentes se analizan en el citómetro CyFlow® Cube 6i (Sysmex Inostics) que separa las partículas con ADN mutado de las partículas con ADN no mutado. Los resultados se analizan con el programa FCS Express. El ratio partículas nativas/mutadas representa de manera precisa el ratio de ADN mutado vs nativo en la muestra de sangre del paciente (**Figura 27**).

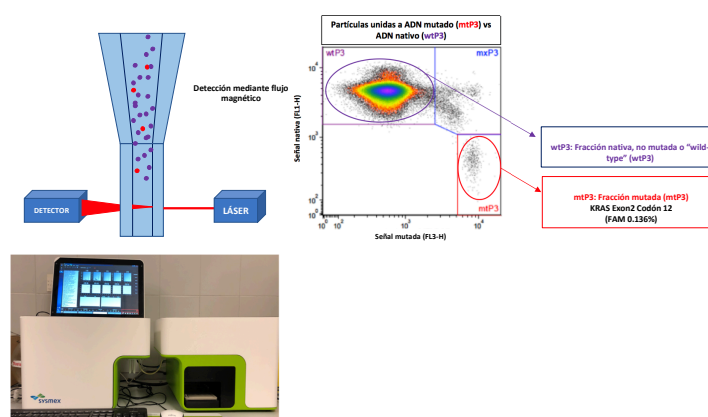


Figura 27. Detección mediante citometría de las partículas con los fragmentos de ADN mutado y no mutado (nativo) unidos a sondas de fluorescencia. Se muestran el funcionamiento del citómetro CyFlow® Cube 6i, (Sysmex Inostics) y la gráfica resultante, que muestra la fracción nativa (wt) y la fracción mutada (mt) (Elaboración propia a partir de ficha técnica de ONCOBEAM).

4.10.6. Secuenciación masiva (NGS)

El análisis de alteraciones en los genes de interés se llevó a cabo mediante un panel personalizado *Truseq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit* (Illumina) y el diseño de los amplicones mediante el programa online *Illumina DesignStudio* (412). El número de amplicones para cubrir todas las regiones de interés fue de 1254, con un tamaño menor de 175 pb, proporcionando una cobertura total del 99%.

- **Genes a secuenciar**

Se seleccionaron 15 genes en base a la frecuencia de sus mutaciones y a su importancia en la carcinogénesis del cáncer de cabeza y cuello (Grupo 4), de acuerdo a la evidencia disponible en el momento de diseño del estudio (año 2016). Los genes a estudiar fueron los siguientes: *CASP8*, *CDKN2A*, *DICER1*, *IRF6*, *NOTCH1*, *NOCTH2*, *NOTCH3*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RB1*, *RIPK4*, *SYNE1*, *SYNE2*, *TP53*, *TP63*.

- **Construcción de librerías**

Se prepararon las librerías siguiendo el protocolo *TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit* (Illumina). Se trata de un protocolo multiplex basado en PCR, en el que se realizan librerías para un juego de amplicones que cubren específicamente una hebra de ADN en todas las regiones diana. Cada una de estas librerías (una por muestra) se marca con una combinación de *index* (adaptadores) característicos para poder identificarlas inequívocamente. El protocolo usado para la generación de las librerías consta de los siguientes pasos (**Figura 28**):

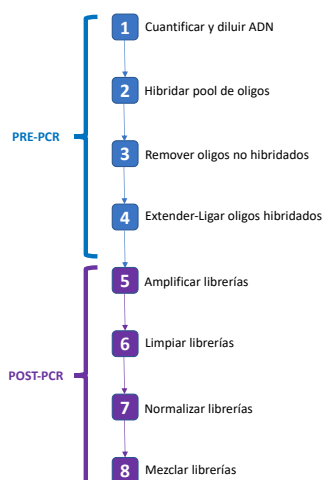


Figura 28. Esquema de los pasos pre- y post-PCR para la generación de librerías con el *Truseq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit* (Illumina) (Figura de elaboración propia tomando como referencia el protocolo del fabricante).

- **Cuantificación y dilución del ADN.** Las muestras eran cuantificadas usando el método fluorométrico QUBIT, y diluidas hasta una concentración apropiada para este protocolo (10-100ng).
- **Hibridación al ADN de la mezcla de cebadores** diseñados específicamente para los amplicones de interés. Además, dichos cebadores están flanqueados por secuencias requeridas en el paso de amplificación
- **Eliminación de los cebadores** que no se han unido al ADN. Para ello se usaron esferas magnéticas que retienen el ADN (Sample Purification Beads), las cuales fueron lavadas tres veces para asegurar la eliminación total de los cebadores no unidos.
- **Extensión desde los cebadores** en sentido ascendente (“upstream”) a través de toda la región diana usando una ADN polimerasa, y unión al extremo 5’ del oligo en sentido descendente (“downstream”) usando una ADN ligasa. De este modo se generan todos los amplicones de interés, los cuales, además, tienen los extremos adaptados para el paso posterior (**Figura 29**).

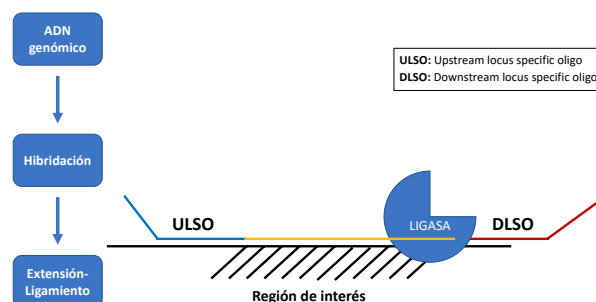


Figura 29. Representación de la fase de extensión-ligamiento para la generación de los amplicones de interés (Figura de elaboración propia tomando como referencia el protocolo del fabricante).

- **Amplificación de los amplicones** producidos en el paso de extensión-ligamiento. Se unen los adaptadores i5 e i7 a los extremos de los amplicones. Estos adaptadores están formados por 3 regiones: a) P5 o P7 (necesarios para la unión a la celda de flujo en el proceso de secuenciación), b) secuencias únicas de 6 nucleótidos que sirven para la identificación de la muestra, y c) secuencia cebadora para la reacción de secuenciación. Después de la amplificación, se purifican los productos eliminando otros componentes de la reacción mediante esferas magnéticas (Sample Purification Beads) (**Figura 30**).

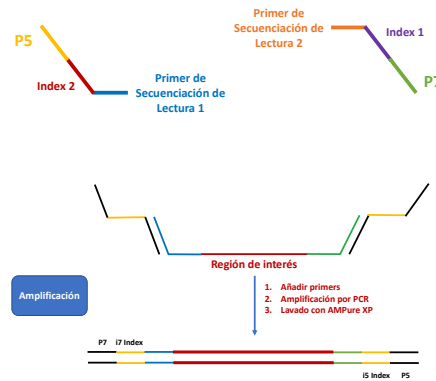


Figura 30. Representación de la fase amplificación de los amplicones generados en el paso de extensión-ligamiento. Se muestran las regiones de los adaptadores i5 e i7 (Figura de elaboración propia tomando como referencia el protocolo del fabricante).

- **Estimación de la calidad** mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Banda de 280-310 pb en base al tamaño medio de los amplicones más los adaptadores.
- **Normalización de la cantidad de cada librería** para que exista una representación balanceada de cada una en la mezcla final que se secuenciará. Se lleva a cabo usando esferas magnéticas (Library Normalization Beads 1).
- **Mezcla de todas las librerías** combinando volúmenes iguales de cada librería.
- **Secuenciación**

Tras la mezcla de las librerías, se diluyó la librería total (1:40) y se desnaturalizó mediante temperatura (2 minutos a 98°C, e inmediatamente después se colocó en hielo 5 minutos). Para tener un control del proceso de secuenciación, se añadió un 1% de ADN del bacteriófago PhiX (12.5pM). Se transfirieron 600 µl a un cartucho de

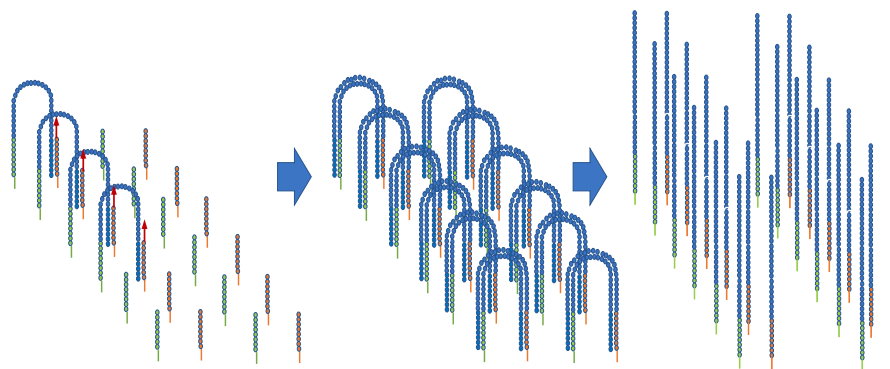


Figura 31. Representación de la fase generación de grupos, mostrando la **amplificación en puente** (Figura de elaboración propia tomando como referencia el protocolo del fabricante).

MiSeq v2 300 ciclos, lo que permitió una longitud de lectura de 2x150 pb. La secuenciación se realizó en la plataforma de secuenciación MiSeq System (Illumina), mediante **3 pasos (Véanse Figuras 31 y 32)**:

- **Generación de grupos.** Los amplicones de la librería total se fijaron en la superficie de la celda de flujo por complementariedad de sus extremos P5 y P7. Mediante *amplificación en puente* se generaron grupos para cada amplicón.
- **Secuenciación paired-end (151 ciclos x2).** Basada en dNTPs modificados, unidos a terminadores reversibles que contienen colorantes fluorescentes. Esto permitió secuenciar a gran escala detectando bases individuales. En cada ciclo se añadieron los 4 dNTPs-terminadores, por lo que la competencia natural minimizó la tendencia a la incorporación. Los colorantes fluorescentes de los terminadores se fotografiaron con la adición de cada dNTP y, a continuación, se eliminaron para permitir la incorporación de la siguiente base

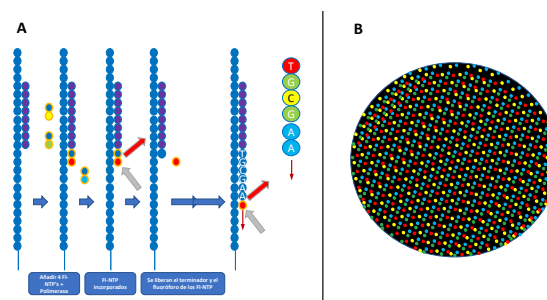


Figura 32. Representación de la secuenciación paired-end (A), y visualización por fluorescencia de los amplicones amplificados (B) (Figura de elaboración propia tomando como referencia el protocolo del fabricante).

- **Primeros pasos del análisis de datos.** Las llamadas de base se efectúan a partir de la intensidad de señal en todos los ciclos. El resultado final es una secuenciación base por base precisa. En el MiSeq System (**Figura 33**) están integrados los primeros pasos para el análisis de los datos brutos de secuenciación o “*trimming*” (eliminación de todas aquellas secuencias que no interesan como índice y oligonucleótidos), identificación de las muestras, alineamiento (archivos BAM) e identificación de variantes (archivos VCF).



Figura 33. Secuenciador Illumina MiSeq (Figura de elaboración propia).

- **Análisis y filtrado de las variantes obtenidas**

Se usó el software VariantStudio (Illumina, Inc.) para identificar y clasificar las variantes detectadas, el cual da información relevante de las mismas como, por ejemplo, si están descritas en Clinical Variant (NCBI), clasificación según varios programas *in silico* de patogenicidad, etc. La visualización de secuencias se realizó con el visualizador IGV (Integrative Genomics Viewer).

Las variantes detectadas fueron sometidas a un primer filtrado, en función de:

- Calidad. El propio MiSeq System establece un filtro de calidad.
- Localización. Se seleccionaron las variantes situadas en la zona codificante o a 15 nucleótidos de distancia del extremo del exón, las cuales podrían afectar al “splicing”.
- Profundidad. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas variantes con más de 500 lecturas en esa posición.
- Biotipos de la variante: se seleccionaron variantes de sentido erróneo, sin sentido e inserciones y deleciones (cambios en el marco de lectura), descartándose las variantes sinónimas.
- Frecuencia de la variante descrita en las bases de datos públicas en población sana: ExAC (Exome Aggregation Consortium) y EVS (ExomeVariant Server). Se descartaron aquellas variantes con una frecuencia alélica mayor del 1%.
- Frecuencia del alelo mutado mayor del 4% para evitar alteraciones debidas a errores de la polimerasa.

Se estableció un orden de prioridad en el estudio de las variantes para su futura validación, según los siguientes criterios:

- Variantes deletéreas: de desplazamiento del marco de lectura, sin sentido y en zonas consenso de “splicing”. También aquellas otras variantes ya descritas como deletéreas.

- Variantes sin clasificar (VSC): Variantes de sentido erróneo, o inserciones o deleciones que no afectan al marco de lectura:
- Predicción de la alteración en la función de la proteína mediante programas *in silico*:
 - MetaSVM: *support vector machine (SVM)-based ensemble prediction score*, que incorpora 10 puntuadores diferentes (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP) y la frecuencia máxima observada de la variante en la población de la base de “1000 genomas”. A mayor valor, mayor probabilidad de que la variante sea deletérea.
 - MetaLR: *logistic regression (LR)-based ensemble prediction score*, que incorpora 10 puntuadores (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP) y la frecuencia máxima observada de la variante en la población de la base de “1000 genomas”. A mayor valor, mayor probabilidad de que la variante sea deletérea.
- * PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*), SIFT (*Sorts Intolerant From Tolerant*).
- Predicción de alteración en el proceso de *splicing* mediante HSF (*Human Splicing Finder*)

4.11. TAMAÑO MUESTRAL

Se expone el cálculo y justificación del tamaño muestral para cada uno de los 4 grupos.

- **Grupo 1 (ver definición en Sección 4.4.1.):**

En el momento del diseño de esta parte del estudio (año 2013), el único estudio que había empleado la tecnología IsoFlux™ para el recuento de CTC había observado una tasa de detección de CTC del 87% en una muestra de 15 pacientes con cáncer colorectal, siendo superior a la tasa de detección del 60.7% con el sistema CellSearch® comunicada por nuestro grupo en estudios previos (413). Dada la provisionalidad de los datos disponibles con IsoFlux™, se calculó el tamaño muestral asumiendo una capacidad de detección para IsoFlux™ del 80% en lugar del 87% y del 61% para CellSearch®. Se estimó que para tener una potencia estadística del 80%, con un intervalo de confianza del 95%

y un porcentaje de pérdidas del 30%, el número de pacientes necesario para el contraste de hipótesis unilateral sería necesario reclutar a 50 pacientes con cáncer colorectal avanzado para poder analizar finalmente a 35 pacientes.

- **Grupo 2 (ver definición en Sección 4.4.2.):**

En el grupo 2 se llevó a cabo un estudio piloto generador de hipótesis. Se pretendió buscar mutaciones en KRAS en CTC de pacientes con tumor primario KRAS nativo. Al igual que en el Grupo 1, se asumió una capacidad de detección de CTC para IsoFlux™ del 80%. Se calculó, que para disponer de 20 muestras con CTC recuperables por IsoFlux™ para realizar el análisis mutacional de KRAS en CTC, sería necesario reclutar a 30 pacientes, asumiendo un 20% de pérdidas.

- **Grupo 3 (ver definición en Sección 4.4.2.):**

En el grupo 3 se pretendió estudiar la concordancia entre las CTC y el plasma en el estatus de RAS analizado por BEAMing en pacientes con CCRav RAS nativo y RAS mutado. Al tratarse de un estudio piloto, generador de hipótesis se consideró necesario incluir a 60 pacientes, 30 pacientes con CCRav RAS nativo y 30 pacientes con CCRav RAS mutado, asumiendo una tasa de detección de CTC por IsoFlux™ del 80% y un porcentaje de pérdidas del 20%, para disponer de un total de 40 pacientes con CTC recuperables para su análisis mutacional por BEAMing.

- **Grupo 4 (ver definición en Sección 4.4.3.):**

Estudio piloto generador de hipótesis. Se consideró necesario un mínimo de 15 determinaciones en las que detectar al menos 4 CTC, dado que la cantidad de ADN de 4 CTC está establecida como el límite de detección o cantidad mínima necesaria de ADN para la detección de mutaciones con la mayoría de los métodos de análisis mutacional de alta sensibilidad. Teniendo en cuenta que el sistema IsoFlux™ no había sido empleado nunca antes en pacientes con cáncer de cabeza y cuellos, y que en los pacientes con cáncer de colon de nuestro estudio el 60% de los pacientes tuvieron > 4 CTC con IsoFlux, se consideró necesario realizar 30 determinaciones de CTC para poder detectar > 4 CTC en 15 casos, asumiendo un 20% de pérdidas.

4.12. ANÁLISIS DE DATOS

4.12.1. Variables

- **Grupos 1 y 2 (ver definición en Sección 4.4.1. y 4.4.2.):**
 - **Variables demográficas, anátomo-patológicas y clínicas al diagnóstico de la enfermedad o previas a la extracción de CTC:** sexo, edad, T,N,M y estadio de la AJCC (7ª edición), localización del tumor primario (colon izquierdo, colon derecho, recto), lateralidad del tumor primario (colon izquierdo vs derecho), resección del tumor primario, tipo histológico, grado histológico, otras variables anátomopatológicas (obstrucción, perforación, invasión linfovenosa, invasión perineural, ganglios resecados al diagnóstico), estatus de KRAS en el tumor primario (nativo vs mutado), QT adyuvante y tipo de QT, administración de RT (neo)adyuvante (rectos), número de localizaciones metastásicas al diagnóstico, localización de las metástasis al diagnóstico, cirugía de metástasis, tipo de cirugía de las metástasis, número de líneas y tipo de QT para la enfermedad avanzada, tipo de agente biológico para la enfermedad avanzada (anti-EGFR, anti-VEGF).
 - **Variables demográficas y clínicas en el momento de la extracción de las CTC:** sexo, edad, número de localizaciones metastásicas, localización de las metástasis, valor marcadores tumorales (CEA y CA 19.9), administración y tipo de agentes anti-EGFR antes y después de la extracción de CTC, administración y tipo de agentes anti-VEGF antes y después de la extracción de CTC, tratamiento sistémico inmediatamente anterior a la extracción de CTC, número de CTC contabilizadas mediante CellSearch® en los grupos 1 y 2, número de CTC contabilizadas mediante Isoflux™ en el grupo 1, punto de corte de CTC con valor pronóstico con CellSearch® y con IsoFlux™.
 - **Variables para el cálculo de la supervivencia global y supervivencia estimada a los 24 meses en el grupo 1:** fecha de extracción de las CTC, fecha de última visita o éxitus, estatus en última visita o éxitus (vivo vs fallecido).
 - **Variables para el cálculo de la supervivencia global y supervivencia estimada a los 24 meses en función del mejor punto de corte para CellSearch® e IsoFlux™ en el grupo 1:** fecha de extracción de las CTC, fecha de última visita o éxitus, estatus en última visita o éxitus (vivo vs fallecido).

- **Variables para el cálculo de la supervivencia libre de progresión en el grupo 1:** fecha de extracción de las CTC, fecha de última visita o éxitus, estatus en última visita o éxitus (progresión vs no progresión).
- **Variables para el cálculo de la supervivencia libre de progresión en el grupo 1 en función del mejor punto de corte para CellSearch® e IsoFlux™:** fecha de extracción de las CTC, fecha de última visita o éxitus, estatus en última visita o éxitus (progresión vs no progresión).
- **Variables para el análisis mutacional en el tumor primario y en CTC:** estatus mutacional y tipo de mutación en KRAS mediante RT-PCR (Cobas®, TheraScreen®), CLART® mPCR y castPCR™.
- **Grupo 3 (ver definición en Sección 4.4.2.):**
 - **Variables demográficas y clínicas al diagnóstico de la enfermedad o previas a la extracción de CTC:** sexo, edad, T,N,M y estadio de la AJCC (8ª edición), localización del tumor primario (colon izquierdo, colon derecho, recto), resección del tumor primario, tipo histológico, otras variables anatómopatológicas (obstrucción, perforación, invasión linfovenosa, invasión perineural, ganglios resecados al diagnóstico), estatus de KRAS en el tumor primario (nativo vs mutado), QT adyuvante y tipo de QT, radioterapia (neo)adyuvante (rectos).
 - **Variables demográficas y clínicas en el momento de la extracción de las CTC:** sexo, edad, número de localizaciones metastásicas, localización de las metástasis, valor marcadores tumorales (CEA y CA 19.9), número de CTC contabilizadas mediante Isoflux™.
 - **Variables para el análisis mutacional en el tumor primario, en plasma y en CTC:** estatus mutacional y tipo de mutación en RAS mediante tecnología estándar (Cobas®, TheraScreen®, Idylla®) en el tumor primario, estatus mutacional y localización de la mutación en RAS mediante tecnología BEAMing (OncoBEAM™) en ADN de plasma y en ADN de CTC.
- **Grupo 4 (ver definición en Sección 4.4.3.):**
 - **Variables demográficas, anátomo-patológicas y clínicas al diagnóstico de la enfermedad o previas a la extracción de CTC:** sexo, edad, T,N,M y estadio de la AJCC (8ª edición), localización del tumor primario (cavidad oral, orofaringe,

laringe, hipofaringe, glándulas salivares, senos paranasales), tipo histológico, radioterapia adyuvante, QT adyuvante y tipo de QT, enfermedad platino-refractaria vs platino-sensible, tratamiento previo con cetuximab, número de líneas de QT para la enfermedad avanzada previas a la extracción de CTC.

- **Variables demográficas y clínicas en el momento de la extracción de las CTC:** sexo, edad, tipo de enfermedad recurrente o metastásica (local sola, local y a distancia, a distancia sola), número de CTC con Isoflux™.
- **Variables para el análisis mutacional en el tumor primario, en plasma y en CTC:** estatus mutacional (nativo vs mutado) y tipo de mutación en el tumor primario, en plasma y en CTC empleando PCR digital, estatus mutacional (nativo vs mutado) y tipo de mutación en plasma y en CTC empleando secuenciación masiva (NGS), número de variantes detectadas mediante NGS en plasma y en CTC, concordancia en el tipo de variante encontrada en plasma y en CTC mediante NGS.

4.12.2. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo que resume las variables cuantitativas por su distribución de frecuencia y las variables cualitativas por su media y desviación estándar (\pm SD) o su mediana y rango. La prueba de la χ^2 se usó para las variables cualitativas y la prueba de la U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas no distribuidas normalmente. Para evaluar la concordancia en el recuento de CTC entre CellSearch® e Isoflux™ se realizó un análisis de Bland-Altman. La prueba de Rho de Spearman se usó para estudios de correlación y se realizó un análisis de las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para evaluar la utilidad de los dos sistemas de detección de CTC (CellSearch® e Isoflux™) para predecir la supervivencia. Se calcularon el área bajo la curva (AUC) y sus intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Sobre la base de las coordenadas de la curva, se seleccionó un punto de corte utilizando el índice de Youden. La supervivencia general (SG) se definió como el tiempo desde la recolección de CTC hasta la fecha de la muerte o el último seguimiento. La SG se resumió utilizando el método de Kaplan-Meier y el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox se usó para determinar la importancia de cada sistema de enumeración con sus límites seleccionados en la predicción de muerte. La discriminación del modelo se probó

mediante el cálculo de la estadística C de Harrell después de ajustar el modelo de riesgos proporcionales de Cox. El estadístico C (c) es la probabilidad de concordancia entre la supervivencia observada y predicha basada en pares de individuos, con $c = 0.5$ para predicciones aleatorias y $c = 1$ para un modelo perfectamente discriminatorio. La significación estadística se estableció a un valor de $p < 0.05$. El paquete estadístico Stata para Windows® versión 12.0 (StataCorp LP, College Station, TX) se utilizó para todos los cálculos estadísticos.

5. RESULTADOS

“Luego que esta carta veáis, toméis dos personas de las que han venido con vos, las más cuerdas y de mejor razón, y os partáis y vengáis con ellos donde yo estuviere;...Y cuando viniéredes, traeréis con vos todas las escrituras, relaciones de autos que en el dicho viaje habéis fecho”

Carta del Emperador Carlos V a Juan Sebastián Elcano

Consuelo Varela Bueno. Regreso. 15. La arribada: La llegada a España. “El Viaje Más Largo. La primera vuelta al mundo”.

Acción Cultural Española V Centenario 1ª Vuelta al Mundo

5.1. Parte 1: Comparación de la capacidad de detección y recuento de CTC de los sistemas CellSearch e IsoFlux, en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV).

5.1.1. Características de los pacientes al diagnóstico y en el momento de la extracción de CTC

Se recibieron muestras de sangre periférica para el estudio de CTC de 66 pacientes, 44 para el grupo 1 y 22 para el grupo 2. Tras excluir a 10 pacientes del grupo 1 (3 de ellos fueron reubicados al grupo 2 por estar incorrectamente clasificados como pertenecientes al grupo 1) y a 3 del grupo 2, se incluyó en el análisis del recuento de CTC a 34 pacientes del grupo 1 y a 22 pacientes del grupo 2. Véase **Figura 34** con diagrama de flujo.

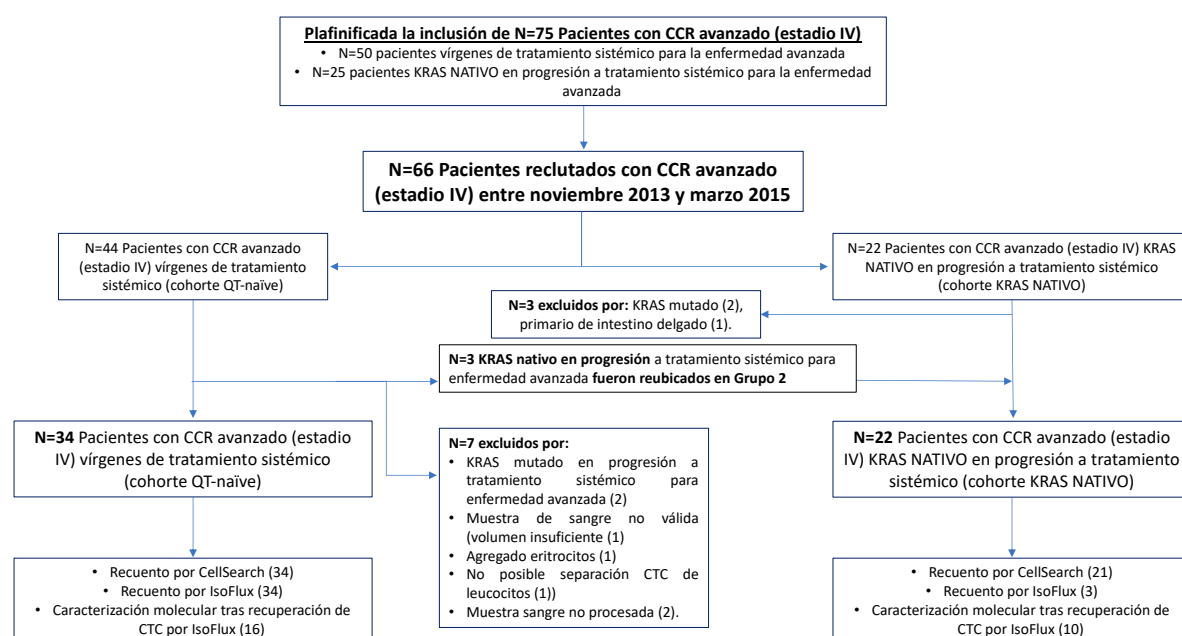


Figura 34. Diagrama de flujo con los pacientes planificados y reclutados para el estudio en cada grupo (Grupo 1: N=50; Grupo 2: N=25), y los finalmente incluidos como válidos para el análisis (Grupo 1: N=34; Grupo 2: N=22) (Elaboración propia).

Los 34 pacientes incluidos en el **grupo 1** eran pacientes vírgenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada y los 22 pacientes del grupo 2 tenían tumores KRAS nativos (KRAS^{NAT}) en progresión a quimioterapia para la enfermedad avanzada (**Tabla 18**). La distribución por sexos fue de 29 varones y 27 mujeres. La mediana de edad al diagnóstico fue de 67 años (rango min-max: 41-84). La mayoría debutó en fase avanzada (66%), siendo las metástasis hepáticas, pulmonares y ganglionares las más frecuentes (86.5%, 24% y 24%, respectivamente).

El 79% fue sometido a resección quirúrgica del tumor primario. De los 18 pacientes diagnosticados en etapas II y III, el 89% recibió quimioterapia adyuvante. Por último, la resección quirúrgica de metástasis a distancia se llevó a cabo en el 36.5% de los pacientes.

En el momento de la extracción de CTC, el 70%, 28%, 21% y 13% presentaban metástasis hepáticas, pulmonares, ganglionares y carcinomatosis peritoneal, respectivamente. El 68% y el 46.8% tenían el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) por encima de sus valores normales (>5 ng/ml y >35 U/ml), respectivamente.

En el **grupo 1**, hubo muestra suficiente para el análisis mutacional de KRAS en el tumor primario, en 33 de los 34 pacientes. De estos, el 54.5% fueron KRAS^{NAT} mientras que el 45.5% fueron KRAS mutados (KRAS^{MUT}).

De los 22 pacientes del **grupo 2**, todos KRAS^{NAT} por protocolo, la distribución de los tratamientos que estaban recibiendo en el momento de la progresión previo a la extracción de CTC fue la siguiente: 9 pacientes (41%) estaban recibiendo quimioterapia en combinación con agentes anti-VEGF, 5 pacientes (23%) agentes anti-EGFR (bien en combinación con quimioterapia, o bien en monoterapia), 4 pacientes (18%) quimioterapia sola y 4 pacientes (18%) se encontraban en descanso terapéutico.

La distribución de la mayoría de las características clínico-patológicas fue equiparable entre los dos grupos, a excepción del estatus de KRAS, nativo en el 52.9% en el grupo 1 frente al 100% de los casos en el grupo 2. Estos resultados se resumen en la **Tabla 18** y en las **Figuras 35, 36 y 37**. Para información sobre otras características de los pacientes ver la **Tabla A1** en la **sección de ANEXOS**.

El **grupo 2** es un grupo muy heterogéneo, siendo la única característica en común de estos pacientes el tener un CCRm KRAS^{NAT}. Esto se debe a que la extracción de sangre para el recuento de CTC se llevó a cabo en cada paciente en momentos diferentes de la evolución de su enfermedad. Por ello, aunque las características de los pacientes del grupo 2 se resumen en la **Tabla 18**, se advierte al lector de que no conforman un grupo homogéneo y por esa razón no se han añadido figuras sobre las características de los pacientes de este grupo, limitándose las figuras del descriptivo a los pacientes del grupo 1.

Tabla 18. Resumen de las características de los pacientes.

VARIABLE		GRUPO 1 N=34*				GRUPO 2 N=22*			
Sexo (varón:mujer)		14:20				15:7			
Edad en extracción de CTC (mediana)		71 (44-84)				64 (45-81)			
Estadio al diagnóstico según AJCC 7ª Edición (2010)		I: 2.9%	II: 8.8%	III: 20.6%	IV: 67.6%	I: 0	II: 9.1%	III: 27.3%	IV: 63.6%
Localización del tumor primario	Colon izquierdo	38.2% (23.5% sigma)				35% (23% sigma)			
	Recto	29.4%				36.4%			
	Colon derecho	32.4%				29%			
Resección del tumor primario		79.4%				77.3%			
Tipo histológico	Mucinoso	12.1% (4/33)				12.5% (2/16)			
	Sin especificar (NOS)	87.9% (29/33)				87.5% (14/16)			
Grado histológico	Grado 1	56.5% (13/23)				35.7% (5/14)			
	Grado 2	30.4% (7/23)				57.1% (8/14)			
	Grado 3	13.04% (3/23)				7.1% (1/14)			
Quimioterapia adyuvante		39.1% (9/23)				70% (7/10)			
Radioterapia adyuvante (Rectos) [N]		70% (7/10) [N=10]				66.7% (4/6) [N=8]			
Cirugía de metástasis		35.5% (11/31)				38.1% (8/21)			
Nº de líneas de QT para la enfermedad avanzada pre-CTC (mediana)		0				3 (1-7)			
Nº de líneas de QT para la enfermedad avanzada pre- y post-CTC (mediana)		2 (0-4)				3 (1-7)			
QT basada en fluoropirimidinas	1ª línea	100%				100%			
	2ª línea	73%				80%			
	3ª línea	66%				92%			
Agentes anti-EGFR	Previo a CTC	0				16/20 (80%)			
	Posterior a CTC	4/34 (11.8%)				3/20 (15%)			
Agentes anti-VEGF	Previo a CTC	0				16/20 (80%)			
	Posterior a CTC	8/34 (23.5%)				5/20 (25%)			
Tratamiento sistémico inmediatamente anterior a extracción de CTC	AntiVEGF (+ QT)	0				41% (9/22)			
	Anti-EGFR (+/- QT)	0				23% (5/22)			
	QT sola	0				18% (4/22)			
	No tratamiento	0				18% (4/22)			
KRAS (tumor primario)	Nativo	18/34 (52.9%)				22/22 (100%)			
	Mutado	15/34 (44.1%)				0			
	Desconocido	1/34 (2.9%)				0			
Nº de CTC (mediana)	CellSearch®	1 (0-78)				-			
	IsoFlux™	8 (0-419)				-			
Número de órganos afectados por la enfermedad (mediana)		1 (1-5)				-			
Localización de las metástasis en CTC	Hígado	70.6%				68.4% (13/19)			
	Pulmón	23.5%				36.8% (7/19)			

	Gánglios linfáticos	14.7%	31.6% (6/19)
	Peritoneo	14.7%	10.5% (2/19)
	Local	38.2%	15.8% (3/19)
	Hueso	0	5.3% (1/19)
	Otra	5.9%	5.3% (1/19)
Enfermedad hepática exclusiva		26.5%	Mujeres: 3/20 (15%)
			Varones: 6/14 (43%)
CEA > 5 en extracción CTC		69.7% (23/33)	64.7% (11/17)
CA 19.9 > 35 en extracción CTC		46.7% (14/30)	47.1% (8/17)
Tiempo entre el diagnóstico y la extracción de CTC en meses (mediana)		1.93 m (0.43 – 92.3)	-

Grupo 1: pacientes vírgenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada en el momento de extracción de CTC; **Grupo 2:** pacientes KRAS nativos en progresión a tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC. **AJCC:** American Joint Committee on Cancer, **QT:** quimioterapia, **CTC:** células tumorales circulantes, **EGFR:** epidermal growth factor receptor, - : no aplica, m: meses; **NOS:** not otherwise specified, **VEGF:** vascular endothelial growth factor. ***Población total de pacientes de cada grupo.** Para cada variable se indica el porcentaje calculado sobre el número total de pacientes de cada grupo (Grupo 1: N=34; Grupo 2: N=22). En caso de no disponer de datos para todos los pacientes de cada grupo, se indica el porcentaje y el número exacto de pacientes en que se pudo evaluar cada variable.

Para información sobre otras características de los pacientes ver texto principal y **Tabla A1** en la sección de **ANEXOS**.

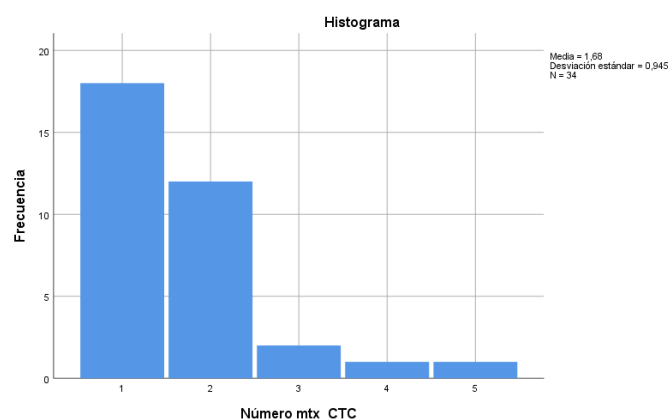


Figura 35. Número de órganos afectados por el tumor en el momento de la extracción de las CTC en los pacientes del grupo 1.

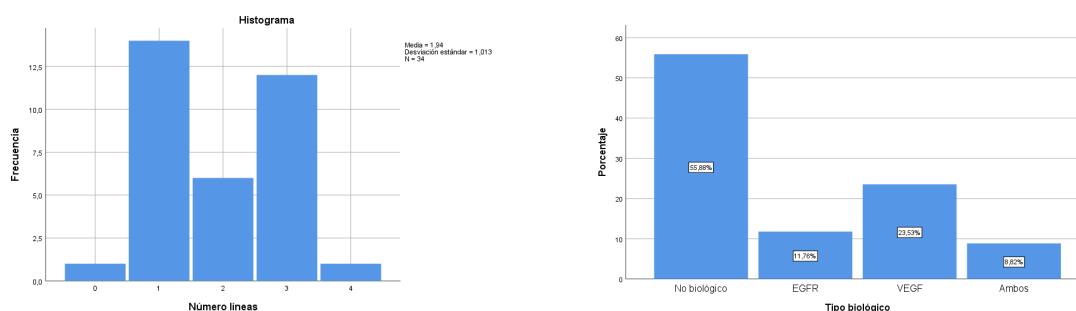


Figura 36. Distribución del número de líneas de tratamiento recibidas por los pacientes del grupo 1 a fecha del corte de datos (Mayo 2019) (izquierda). Tipo de tratamiento biológico en los pacientes del grupo 1 (todos administrados post-CTC), a fecha del corte de datos (Mayo 2019) (derecha).

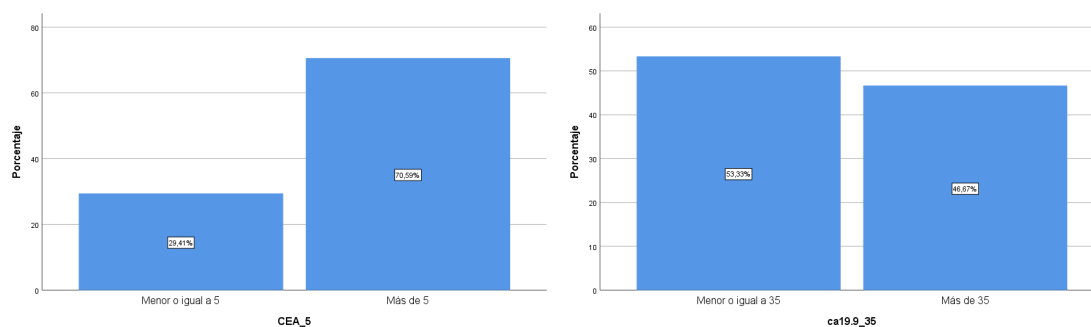


Figura 37. Estatus de los marcadores CEA y CA 19.9 en el momento de la extracción de las CTC en los pacientes del **grupo 1**. CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; El CA 19.9 está elevado cuando es > 35 UI/ml. CEA: antígeno carcinoembrionario; El CEA está elevado cuando es > 5 ng/ml.

5.1.2. Recuento de CTC, asociación con características clínicas y correlación con la supervivencia

5.1.2.1. Recuento de CTC con CellSearch® e IsoFlux™

Las CTC fueron enumeradas con CellSearch® e IsoFlux™ en los 34 pacientes del **grupo 1**.

1. La mediana de CTC detectadas con CellSearch® fue 1 (Min-max: 0-78) y con IsoFlux™ fue 8 (Min-max: 0-419). Véanse **Figura 38** y **Tablas 18-20**.

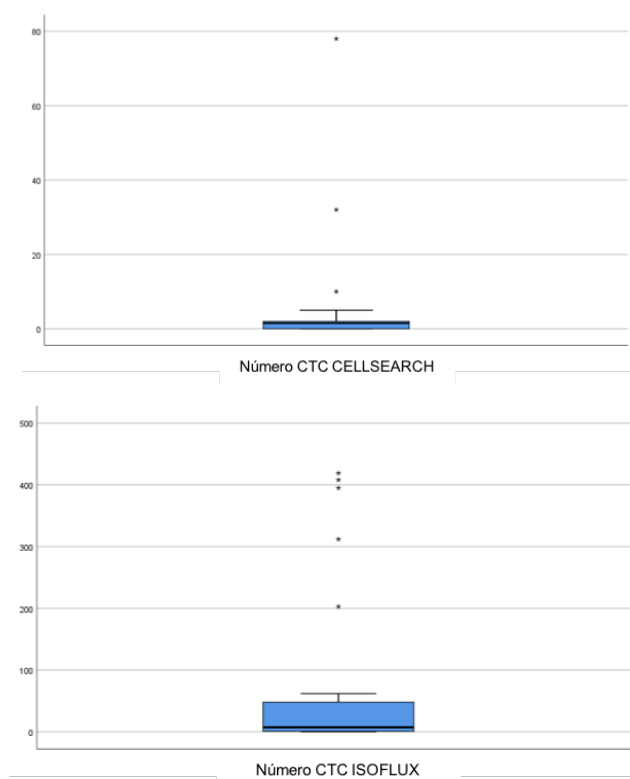


Figura 38. Número de CTC detectadas con CellSearch® (2A) e IsoFlux™ (2B) en pacientes del **grupo 1**. La línea sólida representa la mediana. Nótese que la escala es diferente para cada sistema de detección.

Tabla 19. Recuento de CTC mediante CellSearch e IsoFlux para cada paciente del **grupo 1**.

CÓDIGO PACIENTE	GRUPO	Nº CTC VERIDEX	Nº CTC ISOFLUX
HCSC-1-01	1	4	36
HCSC-1-02	1	2	0
HCSC-1-03	1	78	203
HCSC-1-04	1	2	395
HCSC-1-05	1	0	6
HCSC-1-06	1	0	9
HCSC-1-07	1	0	2
HCSC-1-08	1	1	1
HCSC-1-09	1	2	60
HCSC-1-10	1	0	0
HCSC-1-11	1	1	4
HCSC-1-12	1	5	48
HCSC-1-13	1	1	23
HCSC-1-14	1	2	0
HCSC-1-15	1	4	48
HCSC-1-16	1	0	23
HUPH-1-17	1	2	0
HUPH-1-18	1	3	419
HUPH-1-19	1	1	2
HUPH-1-20	1	2	1
HUPH-1-21	1	0	4
HUPH-1-22	1	0	4
HUPH-1-23	1	0	11
HUPH-1-24	1	1	0
HUPH-1-25	1	2	0
HUPH-1-26	1	10	408
HUPH-1-27	1	2	10
HUPH-1-28	1	2	5
HUPH-1-29	1	1	0
HUPH-1-30	1	4	312
HUPH-1-31	1	32	56
HURSC-1-32	1	1	62
HURSC-1-33	1	1	1
HURSC-1-34	1	0	39

Grupo 1: pacientes vírgenes de tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada. CTC: células tumorales circulantes; HCSC: Hospital Clínico San Carlos de Madrid; HURSC: Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba; HUPH: Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid.

Tabla 20. Recuento de CTC mediante CellSearch e IsoFlux para cada paciente del grupo 2.

CÓDIGO PACIENTE	GRUPO	Nº CTCs VERIDEX	Nº CTCs ISOFLUX
HCSC-2-01	2		65
HCSC-2-02	2	0	
HCSC-2-03	2	1	
HCSC-2-04	2	0	
HCSC-2-05	2	1	
HCSC-2-06	2	2	
HCSC-2-07	2	4	
HCSC-2-08	2	1	193
HCSC-2-09	2	1	296
HUPH-2-10	2	1	
HUPH-2-11	2	4	
HUPH-2-12	2	12	
HUPH-2-13	2	7	
HUPH-2-14	2	1	
HUPH-2-15	2	1	
HUPH-2-16	2	0	
HUPH-2-17	2	6	
HUPH-2-18	2	0	
HUPH-2-19	2	0	
HUPH-2-20	2	2	
HUPH-2-21	2	17	
HUPH-2-22	2	1	

Grupo 2: pacientes en progresión a tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada. CTC: células tumorales circulantes; HCSC: Hospital Clínico San Carlos; HUPH: Hospital Universitario Puerta de Hierro.

5.1.2.2. Asociación del recuento de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ con diferentes características clínicas

Recuento de CTC en función del número de localizaciones metastásicas y tipo de metástasis

La mediana del número de CTC con **CellSearch®** fue significativamente mayor en presencia de ≥ 3 localizaciones metastásicas (≥ 3 vs < 3 : 7 vs 1 CTC, $P=0.01$) y mostró una tendencia hacia la significación estadística con **IsoFlux™** (≥ 3 vs < 3 : 257 vs 5 CTC, $P=0.076$). El número de CTC con **IsoFlux™** fue significativamente mayor en presencia de metástasis pulmonares (Con vs Sin: 61 vs 4 CTC, $P=0.029$). No hubo diferencias en el

número de CTC con ninguno de los sistemas de detección en función de la presencia de metástasis hepáticas ni para los niveles de CEA y CA 19.9 (**Figura 39**).

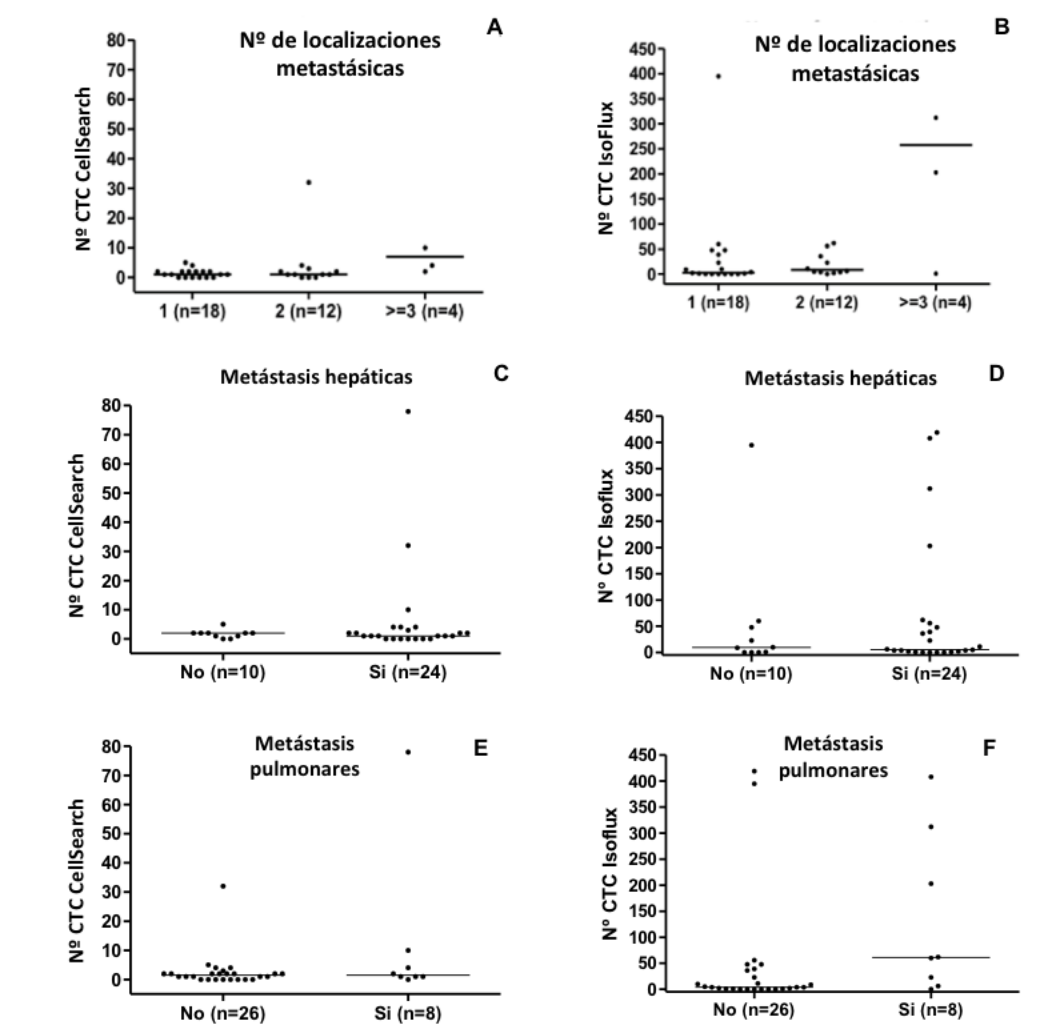


Figura 39. Número de CTC en función del número de localizaciones metastásicas y de la presencia de metástasis pulmonares o hepáticas en pacientes del **grupo 1** (pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC). Con ≥ 3 localizaciones metastásicas frente a <3 , el número de CTC detectados con CellSearch® fue significativamente mayor ($P=0.01$) (A). IsoFlux™ también detectó más CTC pero sin alcanzar significación estadística ($P=0.076$) (B). No se encontraron diferencias en el recuento de CTC con ninguno de los sistemas de enumeración con respecto a las metástasis hepáticas (C, D). No hubo diferencias en el recuento de CTC con CellSearch® (E) para las metástasis pulmonares, pero la mediana del número de CTC con IsoFlux™ fue significativamente mayor si estaban presentes ($P=0.029$) (F). Las líneas continuas representan la mediana. Para más información ver texto principal y **Tabla 21**. CTC: células tumorales circulantes; QT: quimioterapia.

Recuento de CTC en función de la lateralidad del tumor primario y del estatus de KRAS

El número de CTC detectadas tanto con CellSearch como con IsoFlux fue mayor para los tumores de origen en el colon izquierdo, si bien solo con IsoFlux esta diferencia estuvo próxima a la significación estadística. Con CellSearch se detectó una mediana de 2 CTC (0-78) en los tumores de colon izquierdo frente y 1 CTC (0-4) en los de colon derecho ($p=0.417$). Con IsoFlux se detectó una mediana de 10 CTC (0-419) en los tumores de colon izquierdo frente a 1 CTC (0-312) en los de colon derecho ($p=0.089$). No se llevaron a cabo comparaciones formales en función de la lateralidad del primario y del estatus de KRAS dado que el reducido tamaño muestral atomizaría en exceso la muestra (Figuras 40 y 41 y Tablas 21 y 22).

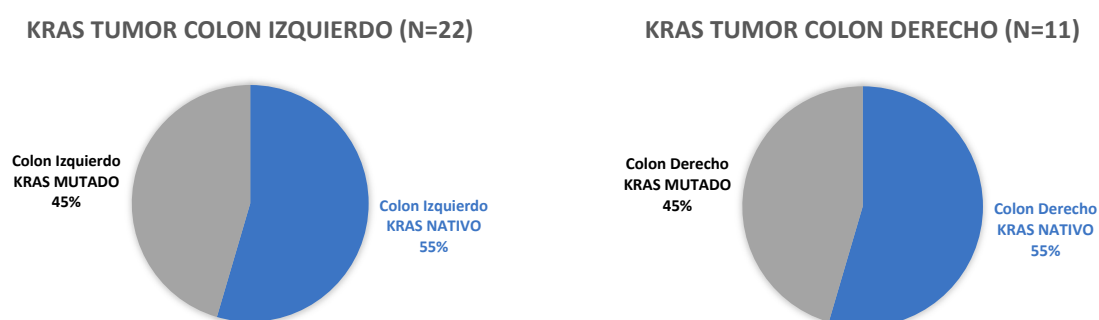


Figura 40. Estatus de KRAS en función de la lateralidad del tumor primario en el grupo 1.

Tabla 21. Asociación entre el estatus de KRAS y la lateralidad del tumor primario en el grupo 1.

VARIABLE		GRUPO 1	
		CellSearch®	IsoFlux™
COLON IZQUIERDO (N=22)	KRAS NATIVO (N=12)	2 (0-78)	39 (0-408)
	KRAS MUTADO (N=10)	1 (0-32)	9 (0-419)
COLON DERECHO (N=11)	KRAS NATIVO (N=6)	2 (0-4)	1 (0-36)
	KRAS MUTADO (N=5)	0 (0-4)	6 (0-312)

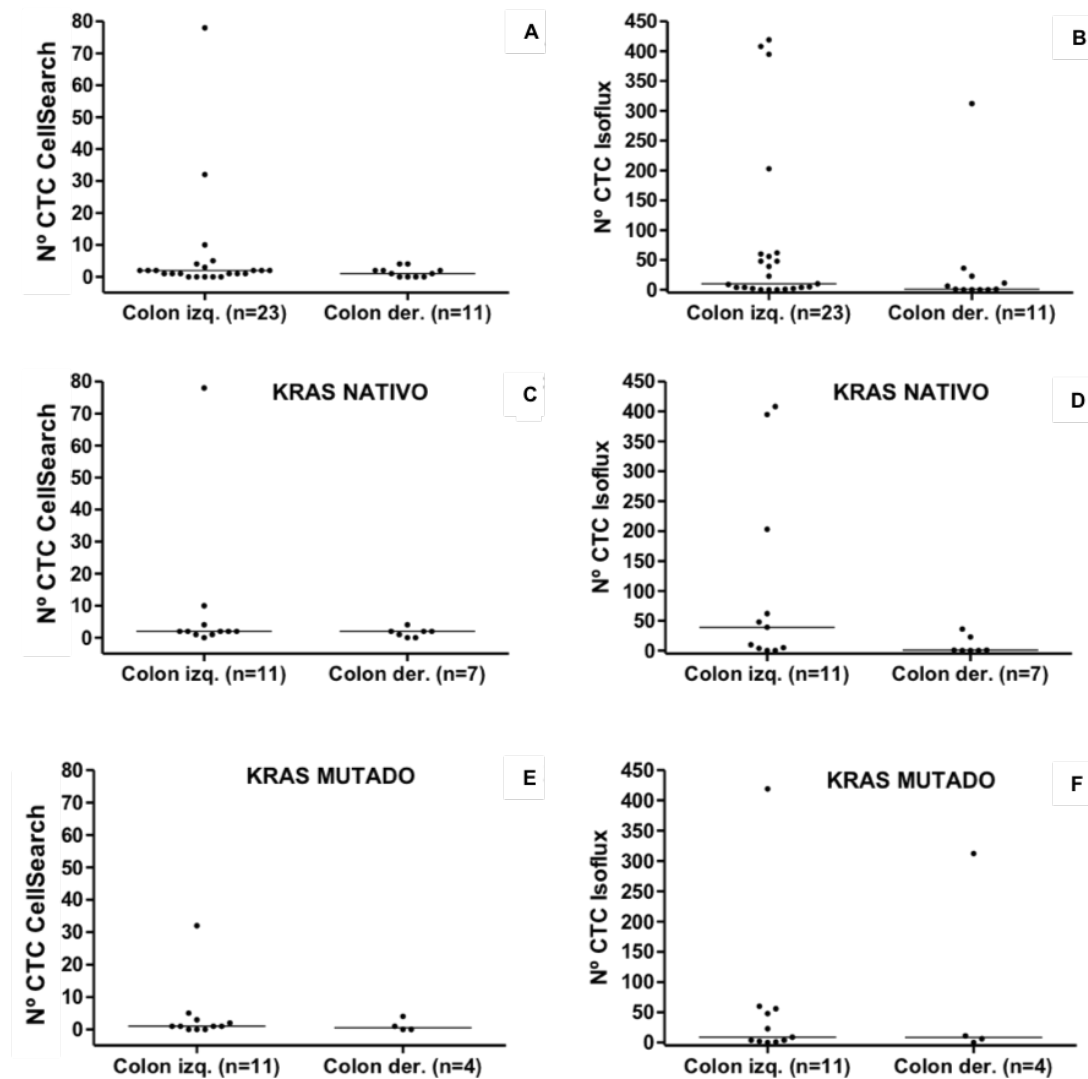


Figura 41. Número de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario (colon derecho vs colon izquierdo) para la población global y para la población KRAS^{MUT} y KRAS^{NAT} en el grupo 1. El número de CTC detectadas fue superior en los tumores de origen en el colon izquierdo en comparación con los del colon derecho tanto con CellSearch ($p=0.417$) como con IsoFlux ($p=0.089$). Para más información ver texto principal y **Tablas 21 y 22**. CTC: células tumorales circulantes; KRAS^{MUT}: KRAS mutado; KRAS^{NAT}: KRAS nativo; QT: quimioterapia.

Tabla 22. Asociación de diferentes características clínicas con el recuento de CTC mediante CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1.

VARIABLE		GRUPO 1	
		CellSearch®	IsoFlux™
Localizaciones afectas: > 1 (n=16) vs 1 (n=18)		1 vs 2 (p=0.167)	3 vs 17 (p=0.061)
Localizaciones afectas: 1 (n=18) vs 2 (n=12) vs > 2 (n=4)		1 vs 1 vs 7 (p=0.033)	3 vs 9 vs 257 (p=0.091)
Nº de CTC (mediana) en presencia de metástasis (P valor)	Localizaciones afectas: ≥ 3 (n=4) vs < 3 (n=30)	7 vs 1 (p=0.01)	257 vs 5 (p=0.076)
	Hígado (Si (n=24) vs No (n=10))	1 vs 2 (p=0.91)	5 vs 9 (p=0.704)
	Pulmón (Si (n=8) vs No (n=26))	1 vs 1 (p=0.349)	61 vs 4 (p=0.029)
	Hígado & Pulmón (Si (n=6) vs No (n=28))	2 vs 1 (p=0.308)	132 vs 4 (p=0.01)
KRAS (Nativo (n=18) vs Mutado (n=15))		2 vs 1 (p=0.221)	7 vs 9 (p=0.663)
Lateralidad del tumor primario (colon izquierdo (n= 23) vs derecho (n=11))		2 vs 1 (p=0.417)	10 vs 1 (p=0.089)

Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC. CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CEA: antígeno carcinoembrionario; CTC: células tumorales circulantes; "P": P-valor. Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

5.1.2.4. Correlación y acuerdo entre CellSearch® e IsoFlux™ y de cada sistema de detección con diferentes variables clínicas.

CellSearch® e IsoFlux™ mostraron una pobre correlación ($\rho=0.411$, $p=0.016$) para la enumeración de CTC. Esta mala correlación se observó para ≥ 3 localizaciones metastásicas ($\rho=0.4$, $p=0.6$) y en presencia de metástasis hepáticas ($\rho=0.473$, $p=0.020$). La correlación mejoró en presencia de metástasis pulmonares ($\rho=0.805$, $p=0.016$), y cuando las metástasis hepáticas y pulmonares coexistían ($\rho=0.812$, $p=0.05$). La correlación fue escasa entre el recuento de CTC por CellSearch® y el valor de CEA ($\rho=0.17$, $p=0.32$) y mejor para CEA y CA 19.9 entre sí ($\rho=0.542$, $p=0.0001$). No hubo correlación significativa entre el recuento de CTC por IsoFlux™ y el valor de CEA ($\rho=0.17$, $p=0.32$) y CA 19.9 ($\rho=0.16$, $p=0.39$) (Tabla 23). El diagrama de Bland-Altman mostró una pobre concordancia entre los dos sistemas de recuento de CTC, de tal forma que a mayor número de CTC se observa una mayor diferencia en el recuento entre los 2 métodos de detección (Figura 42).

Tabla 23. Asociación de diferentes características clínicas con el recuento de CTC mediante CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1. Correlación entre CellSearch® e IsoFlux™ en el recuento de CTC para diferentes variables clínicas.

VARIABLE		GRUPO 1	
		CellSearch®	IsoFlux™
Correlación (P valor)	Global (N=34)	rho=0.411 (p=0.016)	
	Nº de órganos afectados	rho=0.341 (p=0.049)	rho=0.374 (p=0.029)
	≥ 3 órganos afectados (N=4)	rho=0.40 (p=0.6)	
	Hígado (N=19)	rho=0.503 (p=0.02)	
	Pulmón (N=4)	rho=0.805 (p=0.016)	
	Hígado & Pulmón (N=6)	rho=0.812 (p=0.05)	
	CEA (N=33)	rho=0.415 (p=0.003)	rho=0.173 (p=0.321)
	CA 19.9 (N=30)	rho=0.078 (p=0.68)	rho=0.20 (p=0.28)

Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC. CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CEA: antígeno carcinoembrionario; CTC: células tumorales circulantes; "p": p-valor; "rho": coeficiente de correlación calculado por el test de Rho de Spearman. Para más información véase el texto principal.

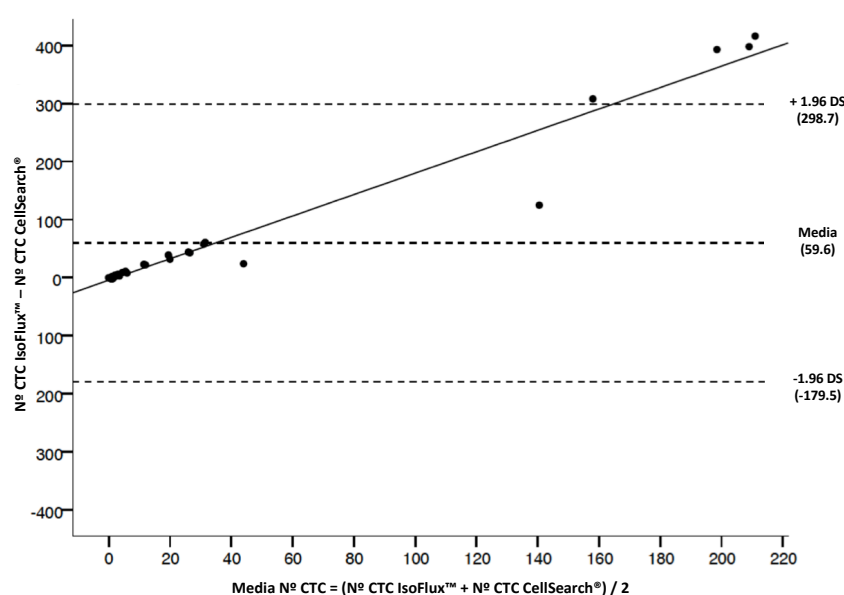


Figura 42. Gráfico de Bland-Altman que muestra el grado de concordancia entre CellSearch® e IsoFlux™ en la detección de CTC en el grupo 1. El diagrama de Bland-Altman mostró una pobre concordancia entre los dos sistemas de recuento de CTC. A mayor número de CTC se observa una mayor diferencia en el recuento entre los 2 métodos de detección.

5.1.3. Supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los pacientes del grupo 1 y grupo 2.

Tras una mediana de seguimiento de 26.1 meses (Min-max: 1.06 – 58.74) en el grupo 1 y de 14.9 meses (Min-max: 2.08 – 65.4) en el grupo 2, la mediana de supervivencia global

fue de 25.7 meses (IC95% 16.3 – 35) en el grupo 1 y de 14.6 meses (IC95% 11.7 – 17.5) en el grupo 2. No se comparó la supervivencia de un grupo con otro dado que se trata de grupos en etapas distintas de la enfermedad, estando, además, el grupo 2 compuesto por una población especialmente heterogénea (**Figura 43**).

Dado el limitado tamaño muestral y su posible impacto en la capacidad discriminativa de los puntos de corte seleccionados, se repitió el análisis censurando los datos para una supervivencia estimada de 24 meses. En la **Figura 43** se muestran las curvas de supervivencia estimada a 24 meses para cada grupo. Por último en la **Figura 43**, se muestra también la curva de SLP en el grupo 1. No se muestra la del grupo 2 dada la heterogeneidad de los pacientes de este grupo desde el punto de vista terapéutico.

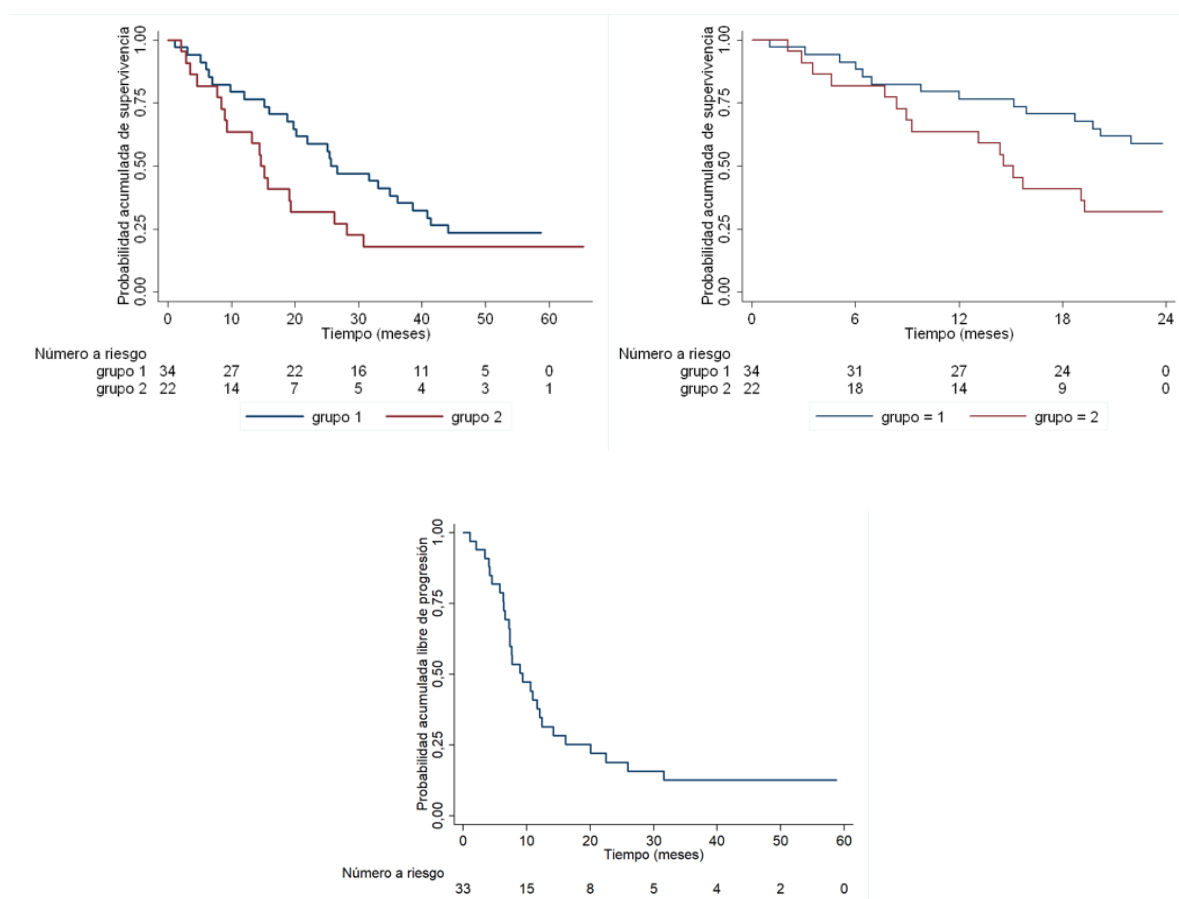


Figura 43. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) (izquierda) y SG censurada a los 24 meses de supervivencia estimada en cada grupo desde la extracción de CTC. Curva de supervivencia libre de progresión (SLP) en el grupo 1.

5.1.4. Asociación de diferentes características clínicas con la supervivencia en grupo 1.

Supervivencia global

No hubo diferencias en la supervivencia global (SG) en función del estatus de KRAS, de la edad, ni de haber recibido tratamiento biológico o no, ni del tipo de tratamiento biológico recibido. La SG fue significativamente mayor en los tumores de origen en el colon izquierdo frente a los del colon derecho (34.75 vs 20.12 meses, $p=0.013$). Los pacientes con valores de CEA normales tuvieron una SG significativamente mayor (< 5 vs > 5 : 40.6 vs 25.2 meses, $p=0.05$), al igual que los pacientes con valores de CA 19.9 normales, si bien en este último caso no se alcanzó la significación estadística (< 35 vs > 35 : 38.3 vs 15.8 meses; $p=0.064$). Los pacientes con 1 sólo órgano o localización afectos alcanzaron una SG mayor que aquellos con más de 1, aunque sin alcanzar la significación estadística (31.5 vs 21.9 meses; $p=0.214$). Ver **Tabla 24**, **Figuras 44-47** y **Figuras A1-A4** en la Sección de ANEXOS.

Tabla 24. Supervivencia global en función de diferentes variables clínicas en los pacientes del grupo 1.

SUPERVIVENCIA GLOBAL		Meses	P-valor
Grupo 1	KRAS (Nativo vs Mutado)	25.25 vs 26.47 m	0.770
	Localización tumor primario (colon izquierdo vs derecho)	34.75 vs 20.12 m	0.013
	Edad (< 70 vs ≥ 70)	32.88 vs 25.6 m	0.456
	Tratamiento biológico (sí vs no)	25.5 vs 26.5 m	0.908
	Tipo de tratamiento biológico (ninguno vs anti-EGFR vs anti-VEGF vs ambos)	25.5 vs 5.98 vs 26.5 vs 20.1 m	0.646
	Número de órganos afectos (1 vs > 1)	31.5 vs 21.9 m	0.214
	CEA (< 5 vs > 5)	40.6 vs 25.2 m	0.05
	CA 19.9 (< 35 vs > 35)	38.3 vs 15.8 m	0.064

Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p<0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

Supervivencia libre de progresión

No hubo diferencias en la supervivencia libre de progresión (SLP) en función del estatus de KRAS, de la edad, del número de localizaciones metastásicas, de los valores de CEA y de CA 19.9, ni de haber recibido tratamiento biológico o del tipo de tratamiento biológico recibido. La SLP fue mayor en los tumores de origen en el colon izquierdo frente a los del colon derecho, estando próxima esta diferencia a la significación estadística (10.55 vs 7.17 meses, $p=0.082$). Ver **Tabla 25**, **Figuras 44-47** y **Figuras A1-A4** en la Sección de ANEXOS.

Tabla 25. Supervivencia libre de progresión en función de diferentes variables clínicas en los pacientes del grupo 1.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN		Meses	P-valor
Grupo 1	KRAS (Nativo vs Mutado)	7.66 vs 10.91 m	0.358
	Localización tumor primario (izquierdo vs derecho)	10.55 vs 7.17 m	0.082
	Edad (< 70 vs ≥ 70)	12.03 vs 8.9 m	0.674
	Tratamiento biológico (sí vs no)	10.9 vs 7.7 m	0.258
	Tipo de tratamiento biológico (ninguno vs anti-EGFR vs anti-VEGF vs ambos)	10.9 vs 5.06 vs 7.7 vs 7.2 m	0.703
	Número de órganos afectados (1 vs > 1)	7.7 vs 10.6 m	0.966
	CEA (< 5 vs > 5)	8.91 vs 7.7 m	0.198
	CA 19.9 (< 35 vs > 35)	8.91 vs 7.6 m	0.109

Para más información véase el texto principal. Se resalta **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p<0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

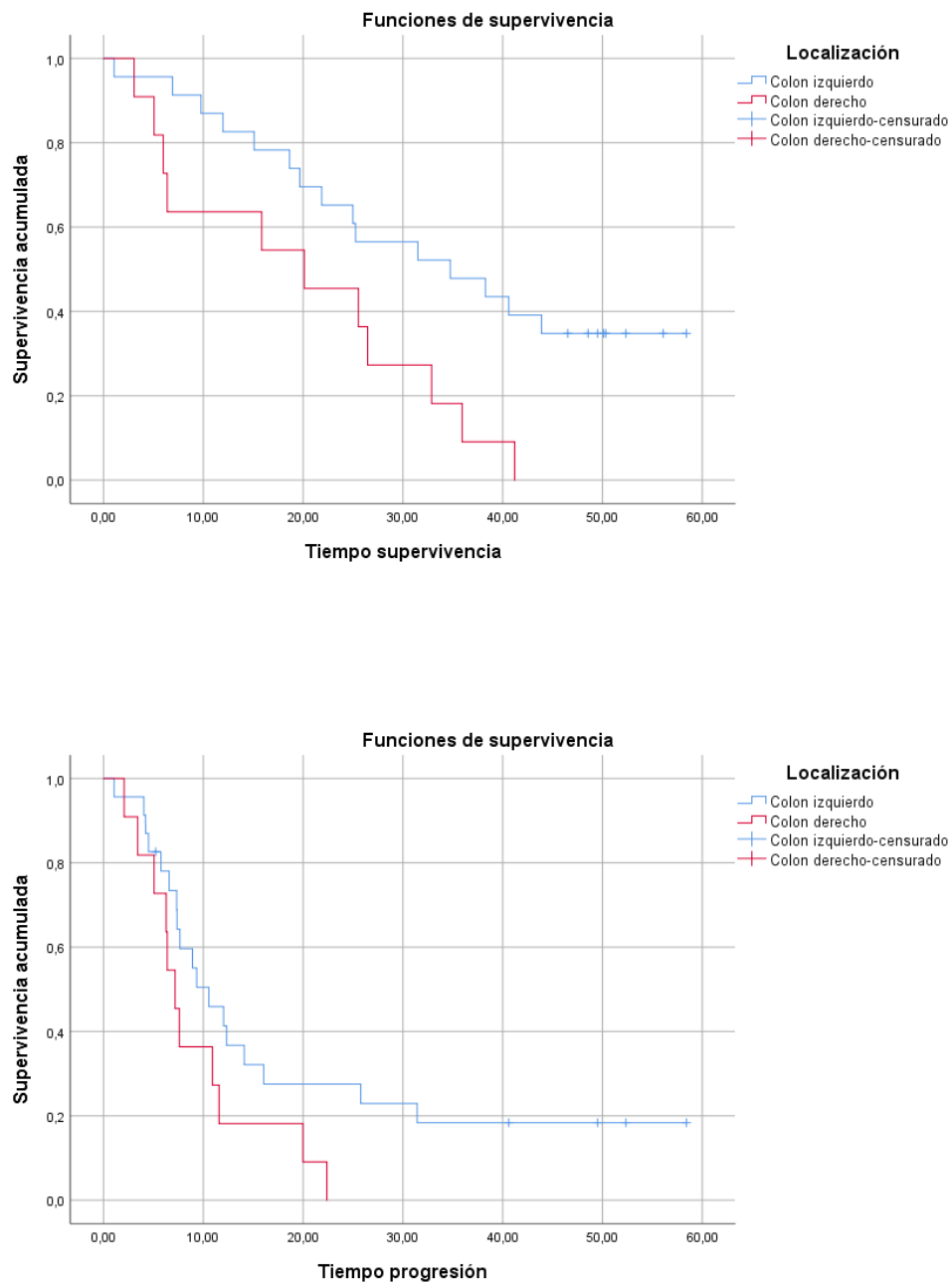


Figura 44. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función la localización del tumor primario (colon izquierdo vs colon derecho) en los pacientes del grupo 1. La SG fue significativamente mayor en los pacientes con tumores de colon izquierdo ($p=0.013$). La SLP fue numéricamente mayor pero sin alcanzar la significación estadística en los pacientes con tumores de colon izquierdo ($p=0.082$).

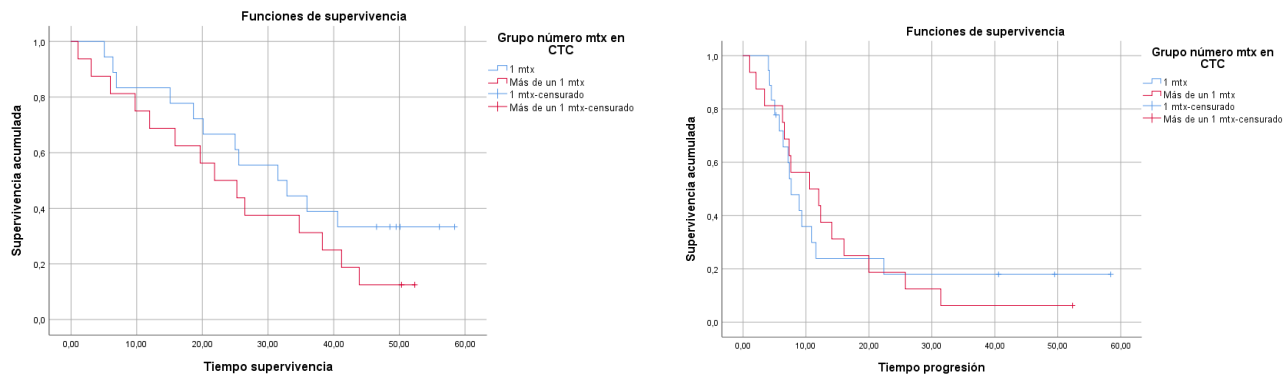


Figura 45. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del número de órganos afectados (1 vs > 1), en los pacientes del grupo 1. No hubo diferencias ni para la SG ($p=0.214$) ni para la SLP ($p=0.966$).

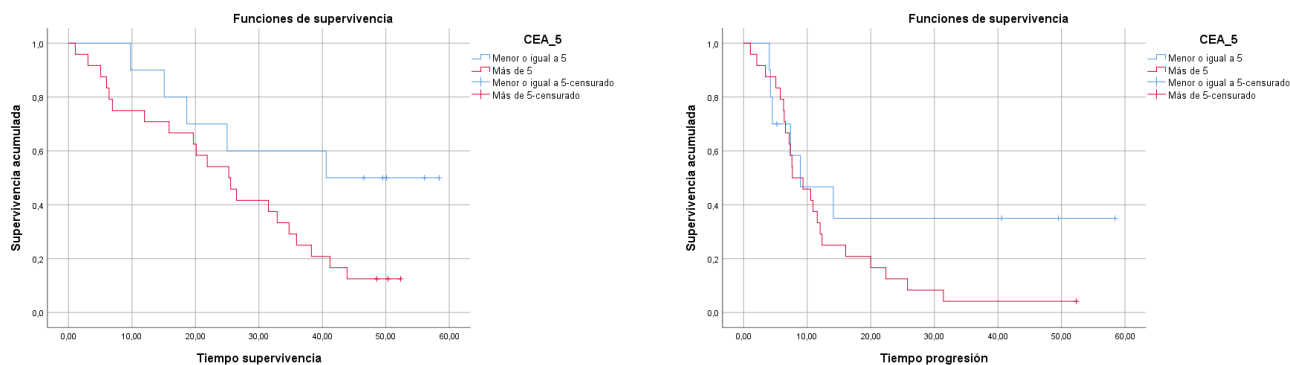


Figura 46. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del valor del marcador CEA (< 5 vs ≥ 5), en los pacientes del grupo 1. La SG de los pacientes con CEA < 5 fue significativamente mayor ($p=0.05$) pero no hubo diferencias en la SLP ($p=0.198$).

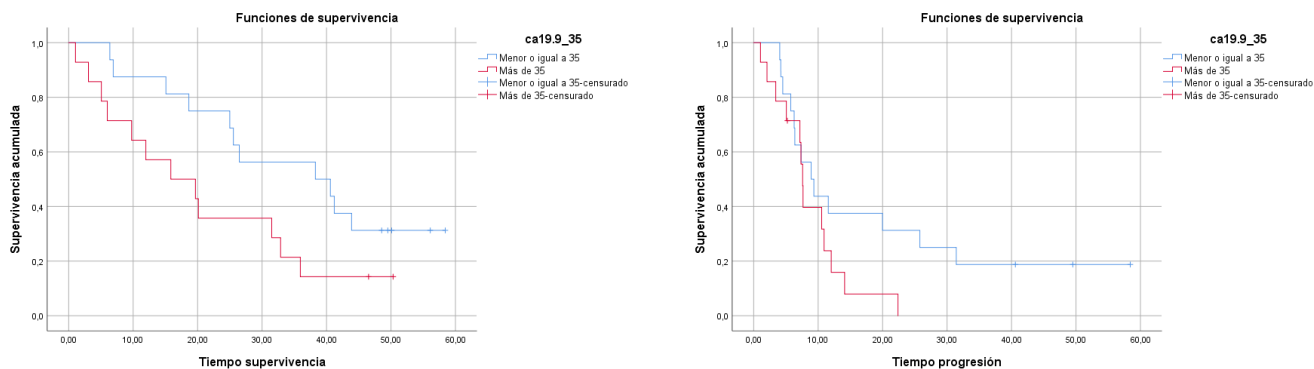


Figura 47. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del valor del marcador CA 19.9 (< 35 vs ≥ 35), en los pacientes del grupo 1. La SG ($p=0.064$) y la SLP ($p=0.109$) de fueron numéricamente mayores en los pacientes con CA 19.9 < 35, aunque sin alcanzar la significación estadística.

5.1.5. Definición de puntos de corte de CTC con cada sistema de recuento y supervivencia global en el grupo 1.

El área bajo las curvas (AUC) COR para la supervivencia global fue baja tanto para CellSearch (AUC=0.613) como para IsoFlux (AUC=0.457), indicando la pobre capacidad predictiva de la supervivencia de los dos métodos de recuento. Véase **Figura A5** en la **sección ANEXOS**.

Empleando las áreas bajo la curva COR y el test de Youden, CTC ≥ 3 con CellSearch® (HR 1.82, IC 95% 0.78-4.23) y CTC ≥ 11 con IsoFlux™ (HR 1.34, IC 95% 0.62-2.90) fueron identificados como los mejores puntos de corte para predecir la supervivencia en el grupo 1, si bien ningún punto de corte demostró una buena capacidad predictiva para ningún método de detección (**Figuras 48 y 49**).

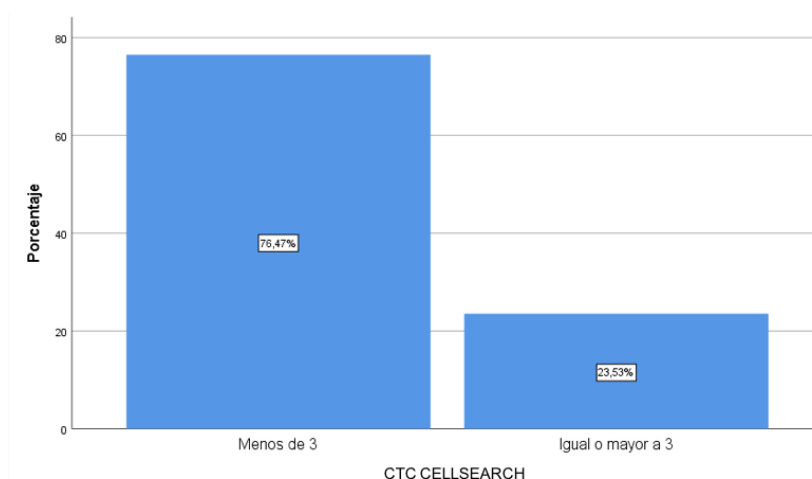


Figura 48. Porcentaje de CTC enumeradas con CellSearch® en función del punto de corte (< 3 vs ≥ 3) en los pacientes del grupo 1.

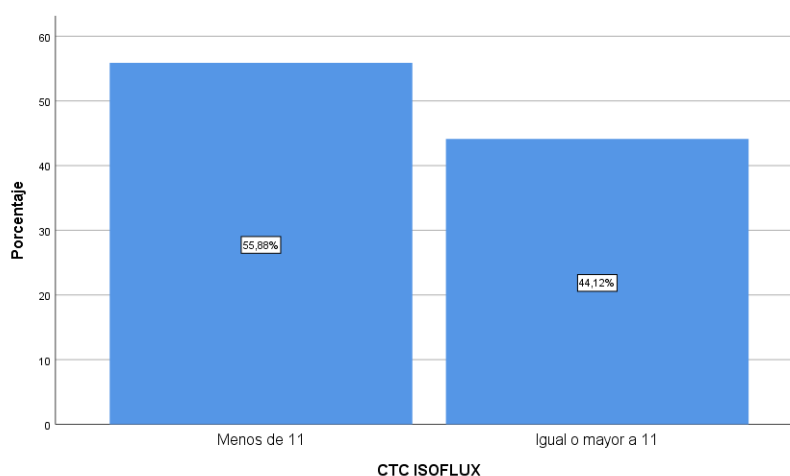


Figura 49. Porcentaje de CTC enumeradas con IsoFlux™ en función del punto de corte (< 11 vs ≥ 11) en los pacientes del grupo 1.

La SG fue mayor con CellSearch® < 3 CTC (CTC < 3 vs ≥ 3: 25.5 vs 21.9 meses, $p=0.158$) y con IsoFlux™ < 11 (CTC < 11 vs ≥ 11: 26.5 vs 21.9 meses, $p=0.459$), aunque sin alcanzar la significación estadística en ninguno de los dos casos. Con el fin de testar la capacidad discriminativa del modelo se calculó el C-estadístico de Harrell. Los valores más altos del C-estadístico en el grupo 1 ocurrieron con CellSearch® ≥ 3 CTC ($c=0.545$) e IsoFlux™ ≥ 11 CTC ($c=0.558$), indicando una capacidad predictiva de la supervivencia similar por parte de ambos sistemas de detección de CTC. Véanse **Figura 50** y **Tabla 26**.

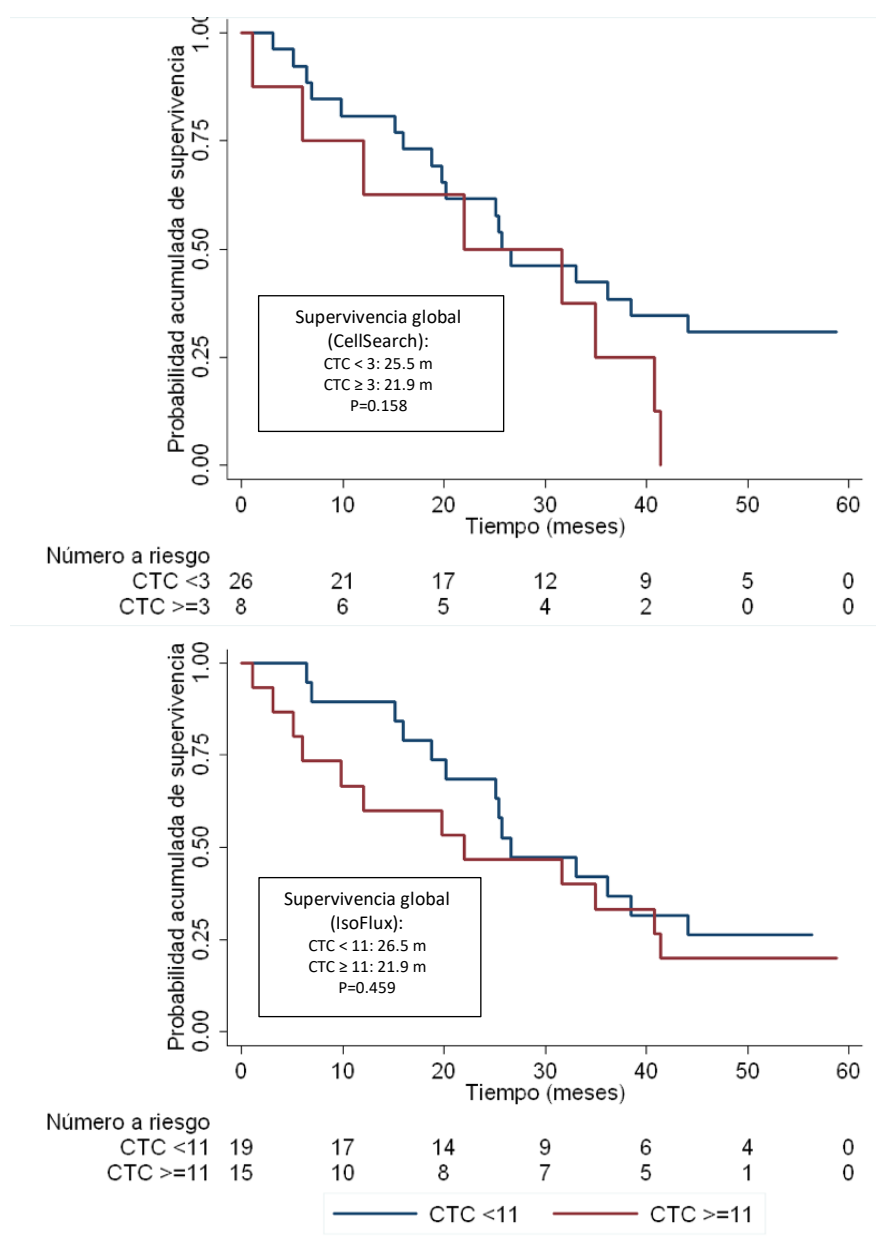


Figura 50. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección en el grupo 1. Los puntos de corte ≥ 3 CTC para CellSearch® (*imagen superior*) y ≥ 11 CTC para IsoFlux™ (*imagen inferior*) se asociaron a un peor pronóstico aunque sin alcanzar la significación estadística ($p=0.158$ y $p=0.459$, respectivamente).

Dado el limitado tamaño muestral y su posible impacto en la capacidad discriminativa de los puntos de corte seleccionados, se repitió el análisis censurando los datos para una supervivencia estimada de 24 meses.

El área bajo las curvas (AUC) COR para la supervivencia estimada a los 24 meses fue baja tanto para CellSearch (AUC=0.0577) como para IsoFlux (AUC=0.500), indicando la pobre capacidad predictiva de la supervivencia de los dos métodos de recuento. Véase **Figura A6 en la sección ANEXOS**.

Empleando las áreas bajo la curva COR y el test de Youden, CTC ≥ 2 con CellSearch® (HR 1.42, IC 95% 0.49-4.09), CTC ≥ 3 con CellSearch® (HR 1.46, IC 95% 0.45-4.64) y CTC ≥ 11 con IsoFlux™ (HR 2.14, IC 95% 0.74-6.17) fueron identificados como los mejores puntos de corte para predecir la supervivencia a los 24 meses en el grupo 1, si bien, ningún punto de corte demostró tener una buena capacidad predictiva. El porcentaje de pacientes vivos fue mayor con CellSearch® < 3 CTC (CTC < 3 vs ≥ 3 : 61.5% vs 50%, $p=0.483$) y con IsoFlux™ < 11 (CTC < 11 vs ≥ 11 : 68.4% vs 46.7%, $p=0.114$), aunque sin alcanzar la significación estadística en ninguno de los dos casos. Los valores más altos del C-estadístico a los 24 meses en el grupo 1 ocurrieron con CellSearch® ≥ 2 CTC ($c=0.54$), con CellSearch® ≥ 3 CTC ($c=0.54$) y con IsoFlux™ ≥ 11 CTC ($c=0.61$). Véanse **Figura 51, Tabla 26 y Tablas A2, A3 y A4 en Sección de ANEXOS**.

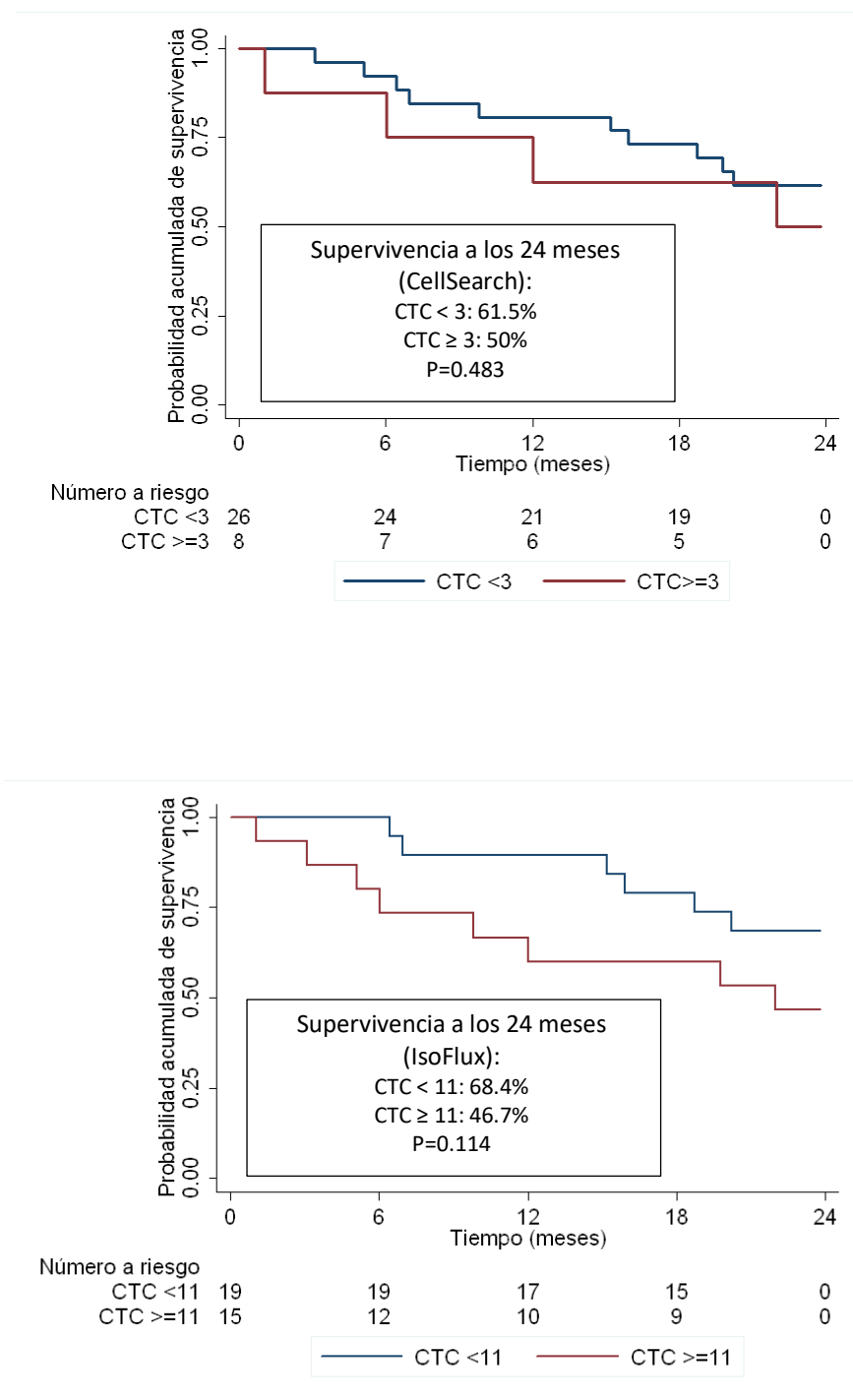


Figura 51. Curvas de Kaplan-Meier en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección en el grupo 1 y censuradas a los 24 meses de supervivencia estimada. Los puntos de corte ≥ 3 CTC para CellSearch® (*imagen superior*) y ≥ 11 CTC para IsoFlux™ (*imagen inferior*) se asociaron a un peor pronóstico aunque sin alcanzar la significación estadística ($P=0.483$ y $P=0.114$, respectivamente).

Tabla 26. Capacidad discriminativa para la supervivencia medida por el estadístico C, de cada sistema de recuento de CTC, según el punto de corte, de los marcadores tumorales CEA y CA 19.9 y de las CTC y estos marcadores combinados.

Variable		Estadístico C
SG	CEA (≥ 5 vs < 5)	0.58
	CA 19.9 (≥ 35 vs < 35)	0.62
	CellSearch (≥ 3 vs < 3)	0.54
	CellSearch + CEA	0.61
	CellSearch + CA19.9	0.64
	IsoFlux (≥ 11 vs < 11)	0.56
	IsoFlux + CEA	0.64
	IsoFlux + CA19.9	0.62
Variable		Estadístico C
SG-24 meses	CEA (≥ 5 vs < 5)	0.56
	CA 19.9 (≥ 35 vs < 35)	0.66
	CellSearch (≥ 3 vs < 3)	0.54
	CellSearch + CEA	0.66
	CellSearch + CA19.9	0.67
	IsoFlux (≥ 11 vs < 11)	0.61
	IsoFlux + CEA	0.63
	IsoFlux + CA19.9	0.68
Variable		Estadístico C
SLP	CEA (≥ 5 vs < 5)	0.53
	CA 19.9 (≥ 35 vs < 35)	0.56
	CellSearch (≥ 3 vs < 3)	0.53
	CellSearch + CEA	0.55
	CellSearch + CA19.9	0.56
	IsoFlux (≥ 11 vs < 11)	0.56
	IsoFlux + CEA	0.49
	IsoFlux + CA19.9	0.59

Se muestra el valor del estadístico C para cada variable según el punto de corte de referencia. Nótese que al combinar cada sistema de recuento con los marcadores tumorales, aumenta el valor del estadístico C para la supervivencia global y la supervivencia estimada a los 24 meses, mejorando así, ligeramente, la capacidad pronóstica de cada sistema de recuento. SG: supervivencia global, SLP: supervivencia libre de progresión.

5.1.6. Supervivencia global en grupo 1 en función de diferentes características clínicas y de los puntos de corte de cada sistema de recuento.

No hubo diferencias para el estatus de KRAS en función del punto de corte de cada sistema de recuento de CTC. La SG fue significativamente mayor en los pacientes con tumores originados en el colon izquierdo y CellSearch CTC < 3 ($p=0.002$), estando próxima a la significación estadística para los tumores de colon izquierdo e IsoFlux CTC < 11 ($p=0.068$). La SG fue significativamente más corta en los pacientes con más de 1 órgano afecto e IsoFlux CTC ≥ 11 ($p=0.024$), estando próximo a la significación para CellSearch CTC ≥ 3 ($p=0.087$). La SG fue significativamente menor en los pacientes con CEA elevado e IsoFlux CTC ≥ 11 ($p=0.022$) mientras que no hubo diferencias con CellSearch CTC ≥ 3 ($p=0.165$). La SG fue significativamente menor en los pacientes con CA 19.9 elevado con IsoFlux CTC ≥ 11 ($p=0.05$) y estuvo próximo a la significación estadística con CellSearch CTC ≥ 3 ($p=0.06$). Por último la SG fue significativamente más corta en los pacientes con IsoFlux CTC ≥ 11 y 1 única línea de quimioterapia ($p=0.0001$). Los resultados se resumen en la **Tabla 27** y en las **Figuras 52 a 57**.

Tabla 27. Supervivencia global en función de diferentes variables clínicas y del punto de corte de CTC con cada sistema de recuento en los pacientes del grupo 1.

SUPERVIVENCIA GLOBAL			CellSearch		P-valor	IsoFlux		P-valor
			< 3 CTC	≥ 3 CTC		< 11 CTC	≥ 11 CTC	
Grupo 1	KRAS	Nativo	25.2 m	5.9 m	0.469	25.2 m	9.8 m	0.944
		Mutado	26.5 m	21.9 m		26.5 m	21.9 m	
	Localización tumor primario	Izquierdo	43.9 m	21.7 m	0.002	38.3 m	31.5 m	0.068
		Derecho	20.1 m	5.9 m		25.5 m	5.1 m	
	Nº de órganos afectos	1	25.5 m	31.5 m	0.087	25 m	40.6 m	0.024
		> 1	25.2 m	12 m		38.3 m	12 m	
	Nº de líneas	1	NA	1.05 m	0.0001	25 m	6 m	0.48
		> 1	25.5 m	31.5 m		26.5 m	21.9 m	
	CEA	< 5	NA	40.6 m	0.165	25 m	NA	0.022
		> 5	25.5 m	21.9 m		26.5 m	11.9 m	
	CA 19.9	< 35	26.5 m	40.6 m	0.06	25.5 m	41.2 m	0.05
		> 35	19.7 m	5.98 m		32.9 m	9.8 m	

Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p<0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

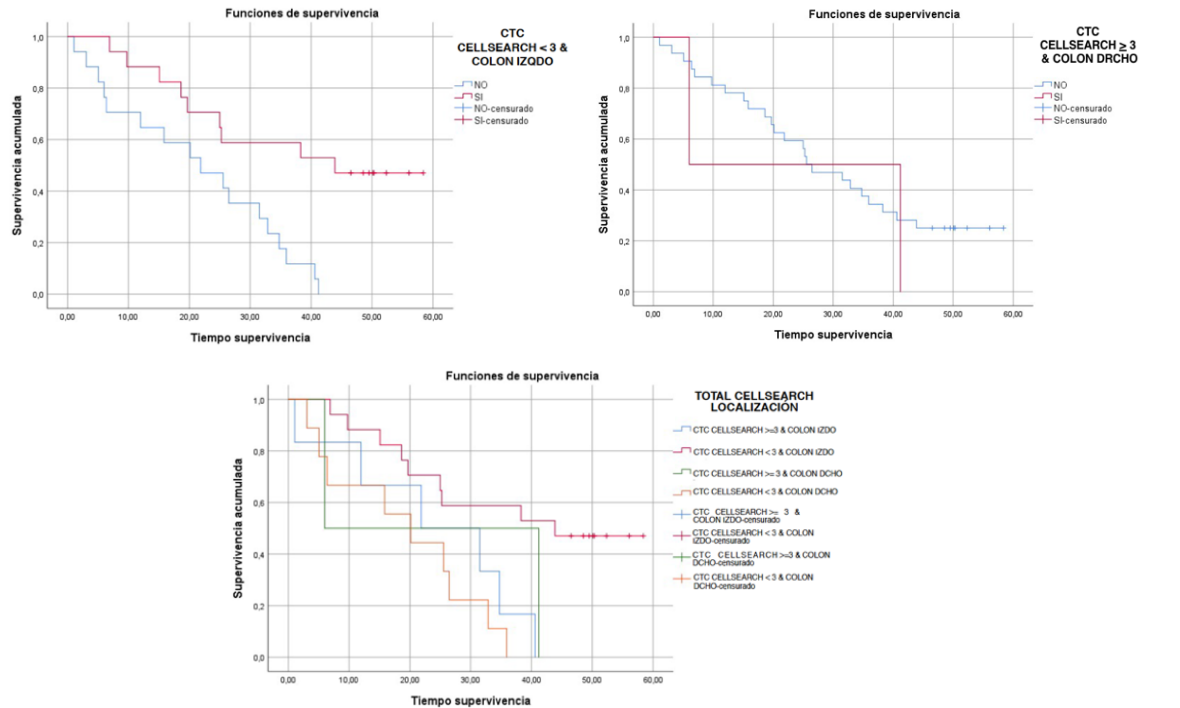


Figura 52. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 3 y colon izquierdo) y peor pronóstico (CTC ≥ 3 y colon derecho). La SG fue significativamente mayor en los pacientes con tumores de colon izquierdo con CTC < 3 frente a los demás subgrupos ($p=0.002$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

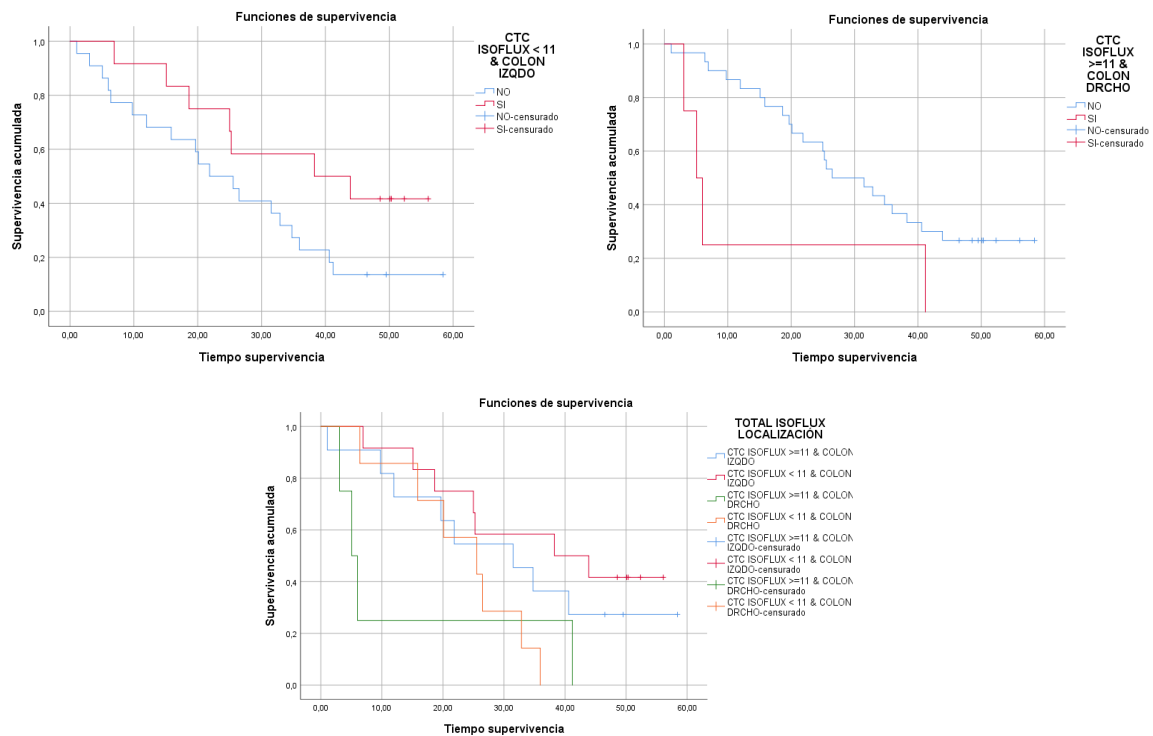


Figura 53. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y colon izquierdo) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y colon derecho). La SG fue mayor en los pacientes con tumores de colon izquierdo con CTC < 11 frente a los demás subgrupos ($p=0.068$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

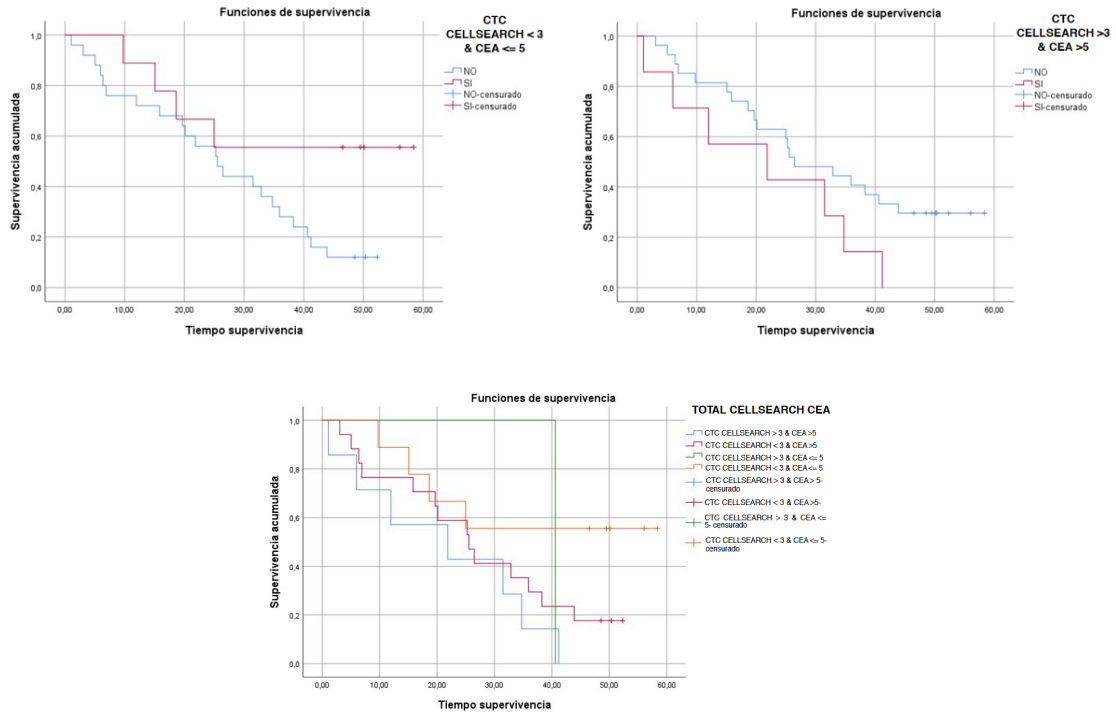


Figura 54. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y del valor de CEA (≤ 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 3 y CEA ≤ 5) y peor pronóstico (CTC ≥ 3 y CEA > 5). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 4 subgrupos ($p=0.165$). CEA: antígeno carcinoembrionario; CTC: células tumorales circulantes.

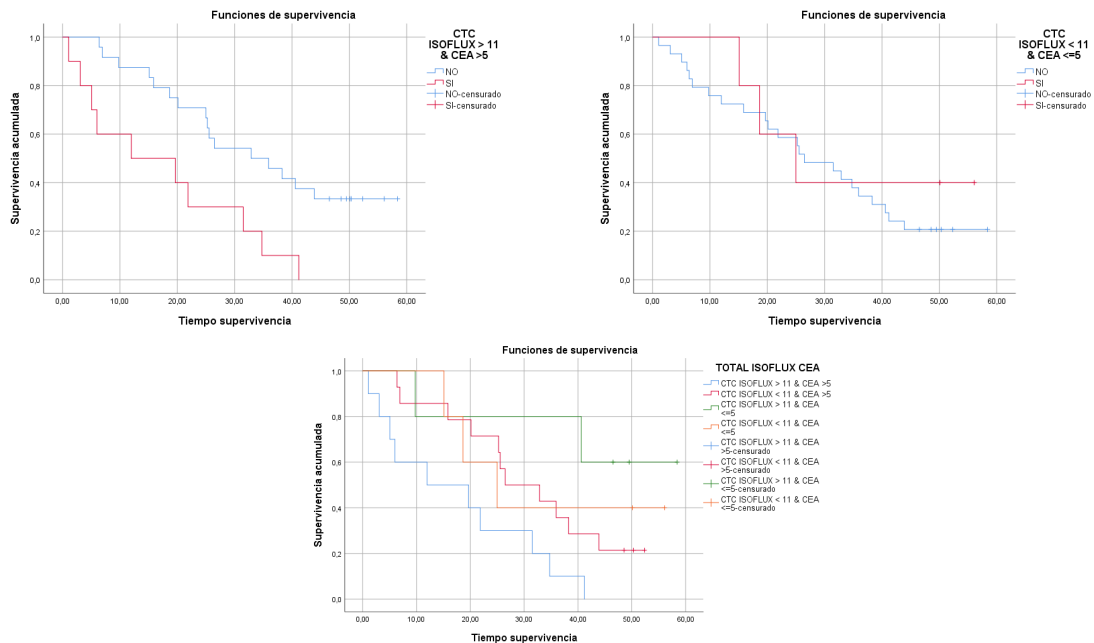


Figura 55. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y del valor de CEA (≤ 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y CEA ≤ 5) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y CEA > 5). La SG fue significativamente peor en los pacientes con CTC ≥ 11 y CEA > 5 frente a los demás subgrupos ($p=0.022$) (gráfica inferior). CEA: antígeno carcinoembrionario; CTC: células tumorales circulantes.

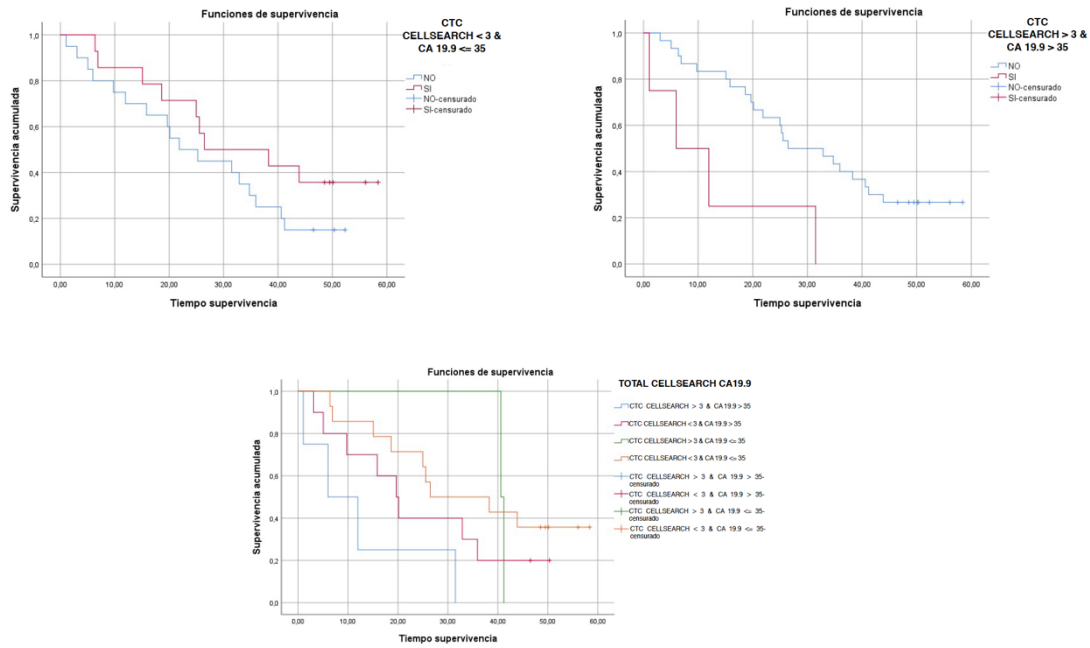


Figura 56. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y del valor de CA 19.9 (≤ 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 3 y CA 19.9 ≤ 35) y peor pronóstico (CTC ≥ 3 y CA 19.9 > 35). La SG fue peor en los pacientes con CTC ≥ 3 y CA 19.9 > 35 frente a los demás subgrupos ($p=0.059$) (gráfica inferior). CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CTC: células tumorales circulantes.

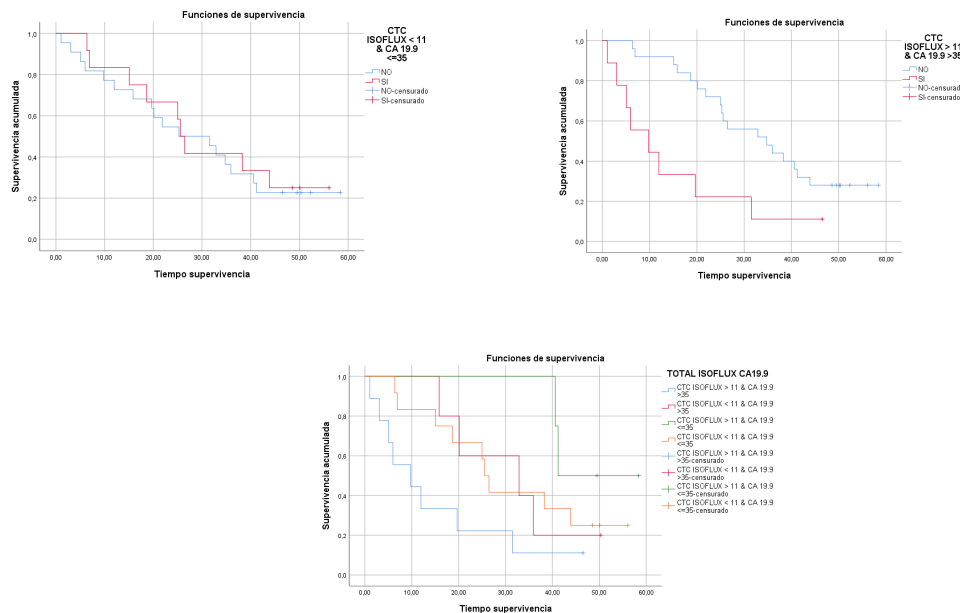


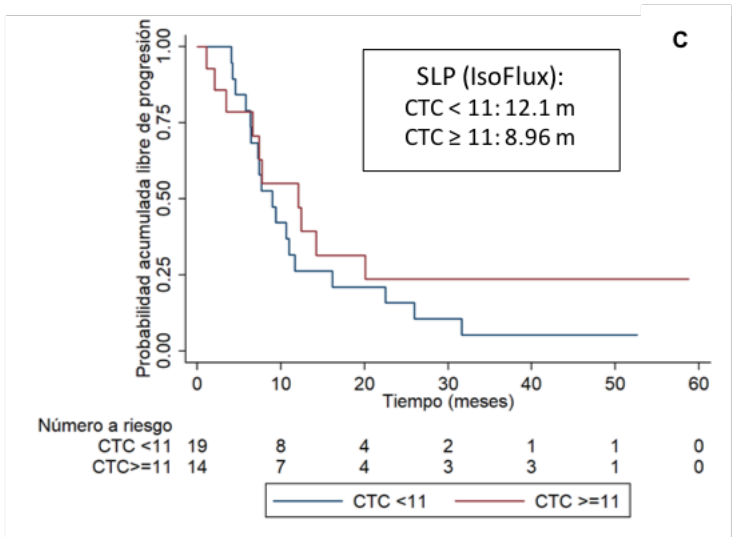
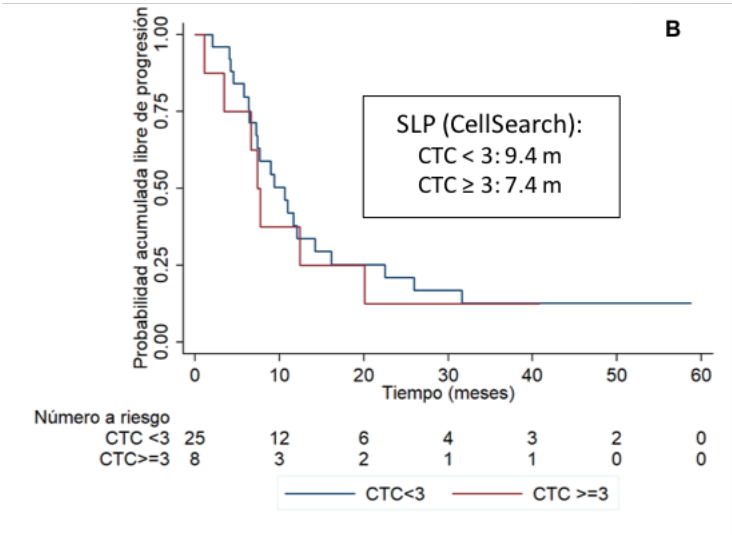
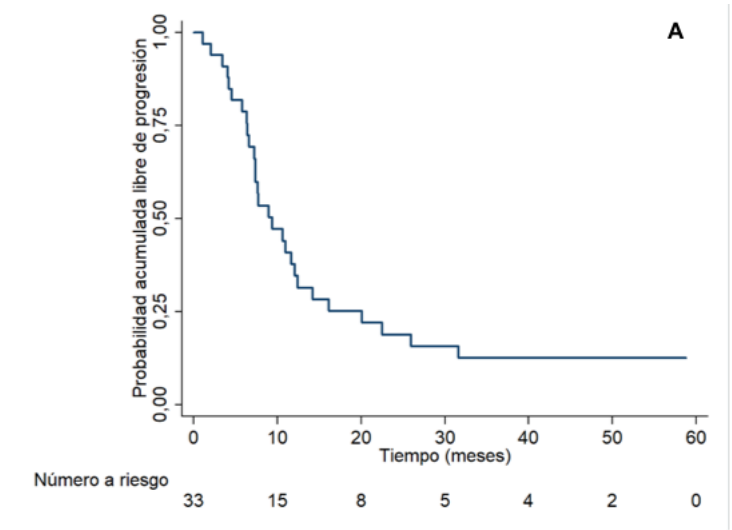
Figura 57. Supervivencia global (SG) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y del valor de CA 19.9 (≤ 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y CA 19.9 ≤ 35) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y CA 19.9 > 35). La SG fue significativamente peor en los pacientes con CTC ≥ 11 y CA 19.9 > 35 frente a los demás subgrupos ($p=0.05$) (gráfica inferior). CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CTC: células tumorales circulantes. No hubo diferencias en la supervivencia global en función del estatus de KRAS (nativo vs mutado) y del punto de corte de CellSearch ($p=0.944$) y de IsoFlux ($p=0.469$).

5.1.7. Supervivencia libre de progresión y definición de puntos de corte de CTC con cada sistema de recuento en el grupo 1.

Tras una mediana de seguimiento de 26.1 meses (Min-max: 1.06 – 58.74) en el grupo 1, la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 9 meses (IC95% 5.4 – 12.5) en el grupo 1 (**Figura 58**).

Empleando las áreas bajo la curva COR y el test de Youden, CTC ≥ 3 con CellSearch® (HR 1.20, IC 95% 0.51-2.82) y CTC ≥ 11 con IsoFlux™ (HR 0.68, IC 95% 0.31-1.48) fueron identificados como los mejores puntos de corte para predecir la SLP en el grupo 1, si bien ninguno demostró ser un buen predictor. La SLP fue numéricamente superior con CellSearch® < 3 CTC (CTC < 3 vs ≥ 3 : 11.7 vs 7.4 meses, $p=0.285$) pero no fue así con IsoFlux™ < 11 (CTC < 11 vs ≥ 11 : 11.1 vs 12.2 meses, $p=0.951$) (**Figura 58**). Con el fin de testar la capacidad discriminativa del modelo se calculó el C-estadístico de Harrell. Los valores más altos del C-estadístico en el grupo 1 ocurrieron con CellSearch® ≥ 3 CTC ($c=0.53$) e IsoFlux™ ≥ 11 CTC ($c=0.53$), indicando una capacidad predictiva de la supervivencia similar por parte de ambos sistemas de detección de CTC. Véanse **Figura 58** y **Tabla A4**, esta última en **Sección de ANEXOS**.

***Figura 58 (Véase en página siguiente).** Curvas de supervivencia libre de progresión en el grupo 1 para la población global (A) y en función del mejor punto de corte seleccionado para cada sistema de detección. Los puntos de corte ≥ 3 CTC para CellSearch® (B) y ≥ 11 CTC para IsoFlux™ (C) se asociaron a un peor pronóstico aunque sin alcanzar la significación estadística ($P=0.68$ y $P=0.68$, respectivamente).*



5.1.8. Supervivencia libre de progresión en el grupo 1 en función de diferentes características clínicas y de los puntos de corte de cada sistema de recuento.

Al estudiar la asociación de los grupos definidos por el punto de corte de cada sistema de recuento con algunas variables dicotómicas, la SLP fue significativamente más corta en los pacientes con IsoFlux CTC ≥ 11 y tanto con CEA elevado ($p=0.004$) como con CA 19.9 elevado ($p=0.011$) y con CellSearch CTC ≥ 3 y CA 19.9 elevado ($p=0.047$). La SLP fue significativamente más corta para los tumores KRAS nativos con CellSearch CTC ≥ 3 ($p=0.03$) y en los pacientes con CellSearch CTC ≥ 3 y CEA elevado ($p=0.047$) frente al resto de subgrupos. El recuento de CTC por IsoFlux no demostró ser un buen predictor de la SLP al combinarse con el estatus de KRAS o la lateralidad del tumor primario. Véanse **Tabla 28** y las **Figuras 59 a 64**.

Tabla 28. Supervivencia libre de progresión en función de diferentes variables clínicas y del punto de corte de CTC con cada sistema de recuento en los pacientes del grupo 1.

SUPERVIVENCIA PROGRESIÓN	LIBRE DE	CellSearch		P-valor	IsoFlux		P-valor
		< 3 CTC	≥ 3 CTC		< 11 CTC	≥ 11 CTC	
KRAS	Nativo	10.55 m	3.42 m	0.03	9.4 m	6.6 m	0.621
	Mutado	8.9 m	12.3 m		7.4 m	12.3 m	
Localización tumor primario	Izquierdo	12 m	7.3 m	0.306	8.9 m	12.3 m	0.186
	Derecho	12.6 m	3.4 m		7.6 m	3.4 m	
Nº de órganos afectos	1	7.4 m	7.7 m	0.345	7.2 m	NA	0.012
	> 1	12.03 m	6.6 m		16.04 m	7.33 m	
CEA	≤ 5	14.3 m	41.2 m	0.176	4.5 m	41.2 m	0.004
	> 5	11.7 m	7.4 m		11.7 m	6.7 m	
CA 19.9	≤ 35	7.4 m	20 m	0.047	6.4 m	NA	0.011
	> 35	10.55 m	3.42 m		10.55 m	7.33 m	

Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

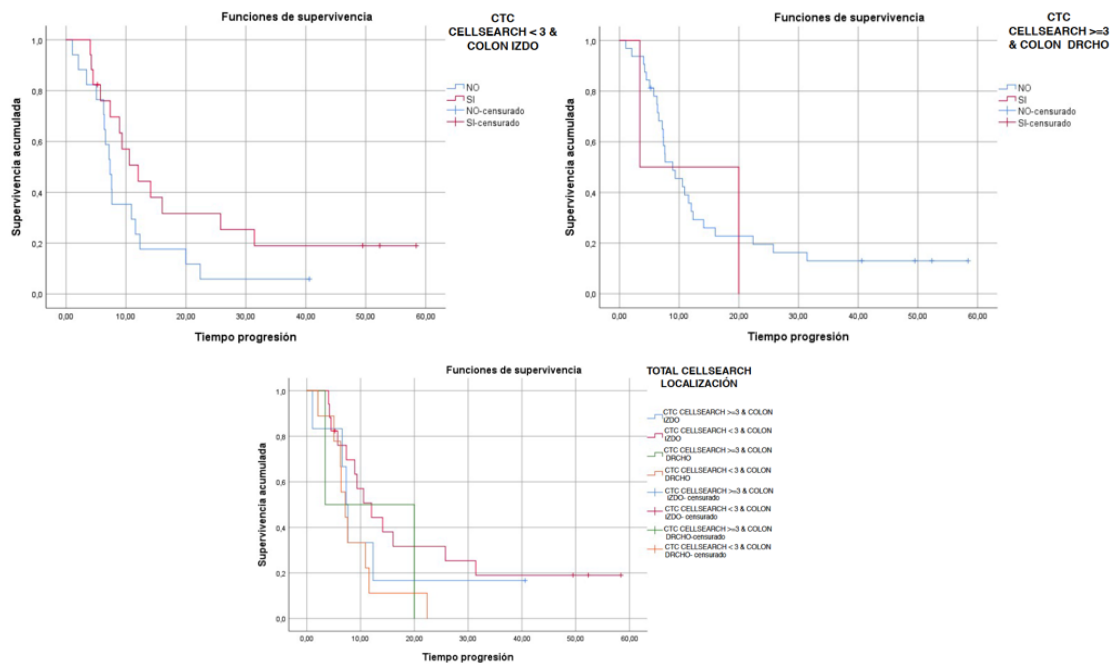


Figura 59. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 3 y colon izquierdo) y peor pronóstico (CTC ≥ 3 y colon derecho). No hubo diferencias significativas en la SLP entre los 4 subgrupos analizados ($p=0.306$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

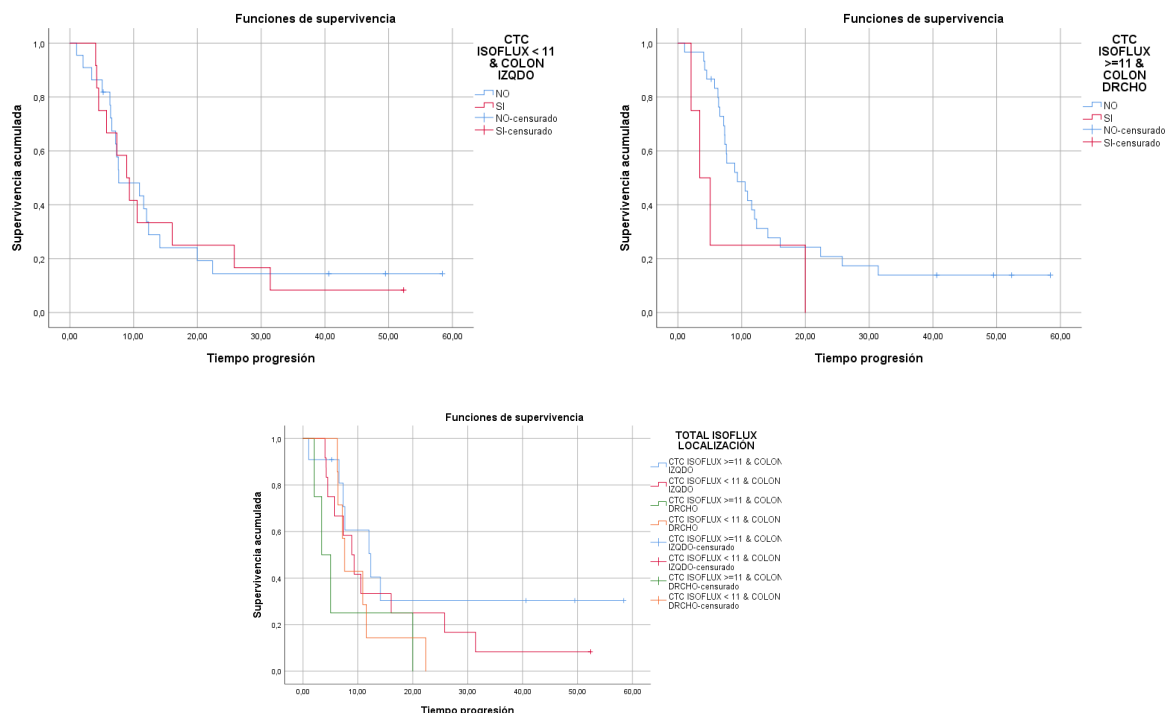


Figura 60. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y de la localización del tumor primario (colon izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y colon izquierdo) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y colon derecho). No hubo diferencias significativas en la SLP entre los 4 subgrupos analizados ($p=0.186$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

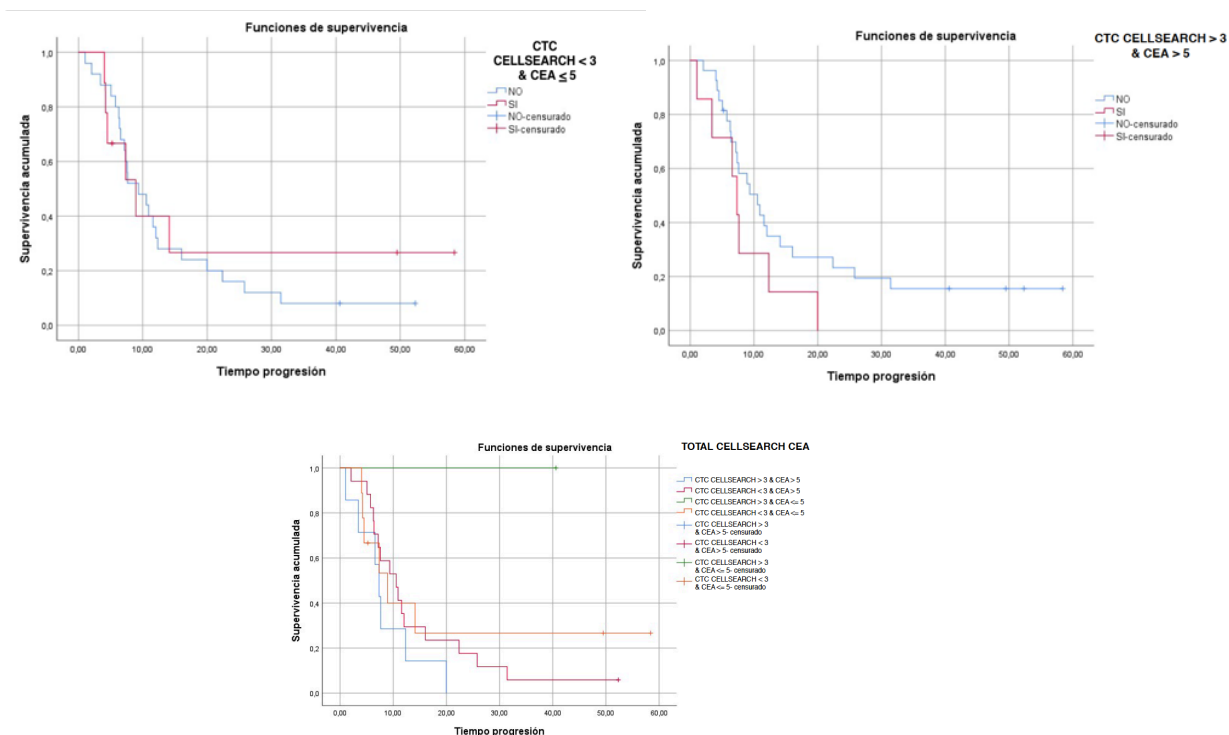


Figura 61. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y del valor de CEA (< 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran el subgrupo de CTC < 3 y CEA < 5 y el subgrupo de CTC ≥ 3 y CEA > 5. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 4 subgrupos ($p=0.176$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

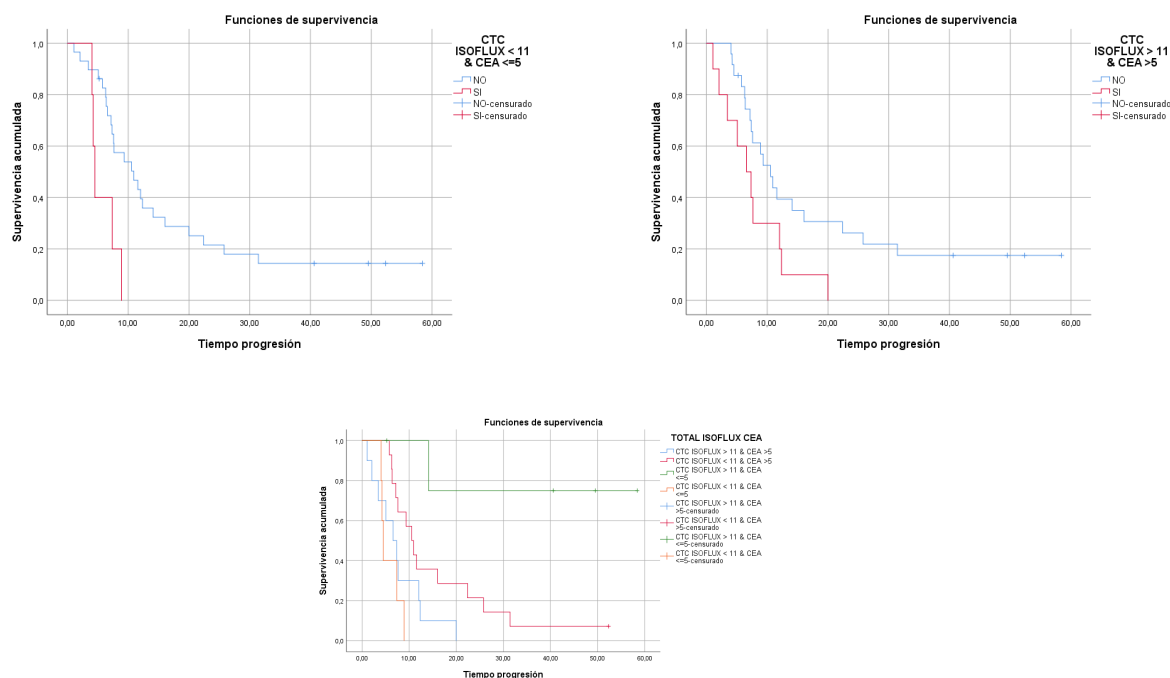


Figura 62. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y del valor de CEA (< 5 vs > 5) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y CEA < 5) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y CEA > 5). La SLP fue significativamente más corta en los pacientes con CTC > 11 y CEA < 5 frente a los demás subgrupos ($p=0.004$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

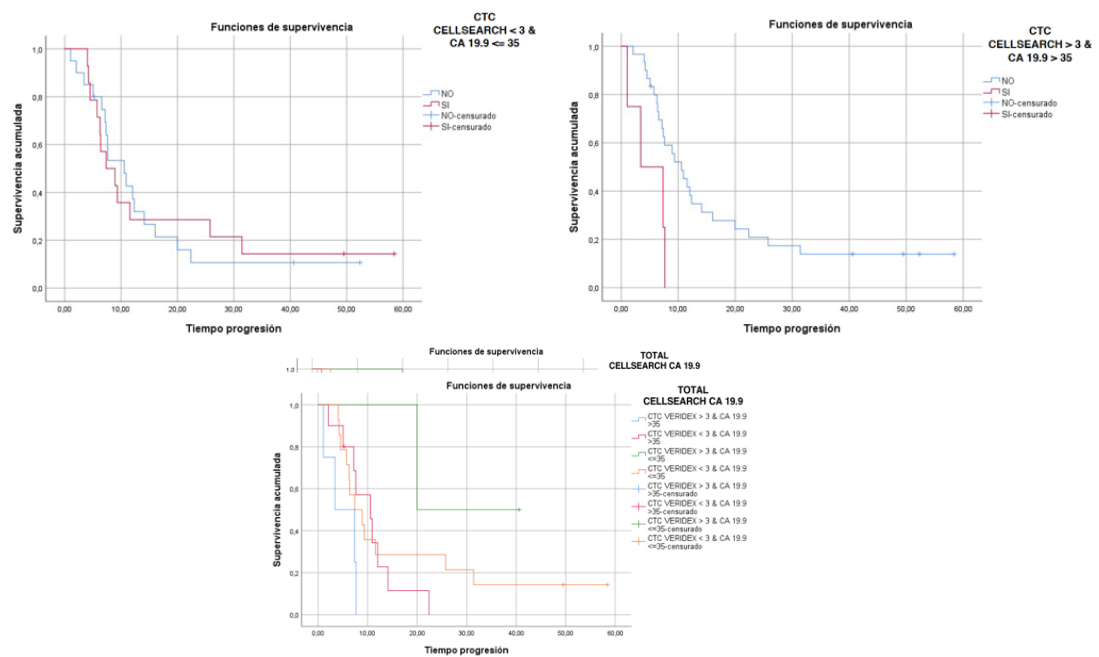


Figura 63. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de CellSearch (< 3 vs ≥ 3) y del valor de CA 19.9 (< 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran el subgrupo de CTC < 3 y CA 19.9 < 35 y el subgrupo de CTC ≥ 3 y CA 19.9 > 35 . La SLP fue significativamente menor en los pacientes con CTC ≥ 3 y CEA < 5 frente a los demás subgrupos ($p=0.047$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

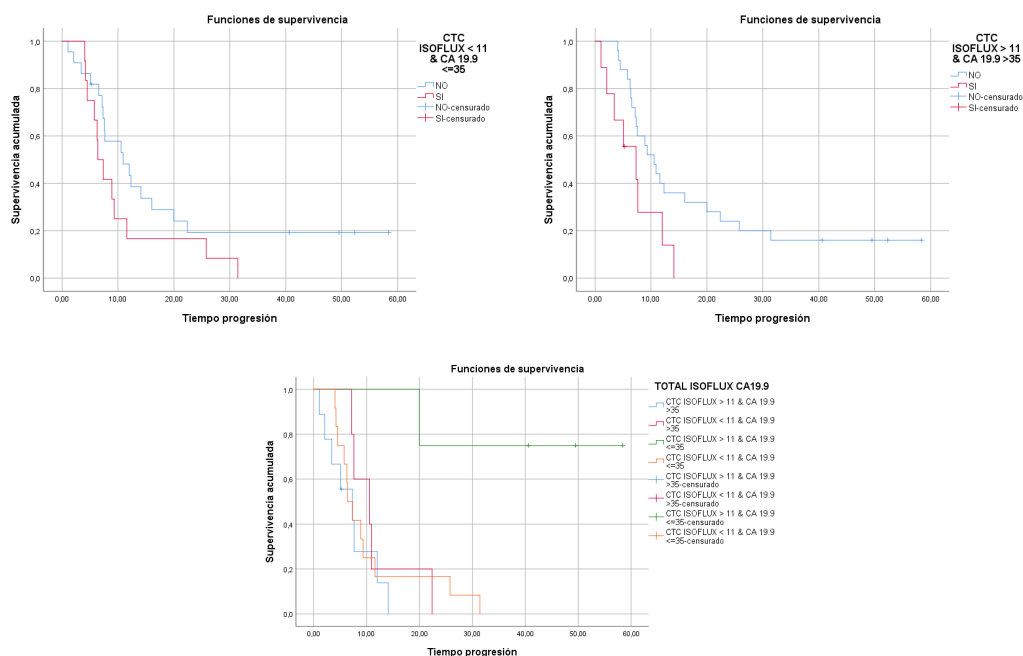


Figura 64. Supervivencia libre de progresión (SLP) en función del punto de corte de IsoFlux (< 11 vs ≥ 11) y del valor de CA 19.9 (≤ 35 vs > 35) en los pacientes del grupo 1. En las dos gráficas superiores se muestran los grupos de mejor (CTC < 11 y CA 19.9 ≤ 35) y peor pronóstico (CTC ≥ 11 y CA 19.9 > 35). La SLP fue significativamente menor en los pacientes con CTC ≥ 11 y CA 19.9 ≤ 35 frente a los demás subgrupos ($p=0.011$) (gráfica inferior). CTC: células tumorales circulantes.

5.1.9. Resumen de la supervivencia en el grupo 1 y capacidad discriminativa de los puntos de corte con cada sistema de recuento.

En la **Tabla 29** se resumen la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en el grupo 1 con cada sistema de recuento de CTC.

Tabla 29. Resumen de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global en el grupo 1, tanto en la población global como en función del punto de corte de CTC.

Variable			Meses (Min-Max) / %	P-valor
Grupo 1	SG		25.7 (1-58.7)	-
	SLP		8.96 (1-58.7)	-
	SG CellSearch	≥ 3	21.9	0.318
		< 3	25.7	
	SG IsoFlux	≥ 11	21.9	0.217
		< 11	26.2	
	SG-24 m CellSearch	≥ 3	50%	0.483
		< 3	61.5%	
	SG-24 m IsoFlux	≥ 11	46.7%	0.114
		< 11	68.4%	
	SLP CellSearch	≥ 3	7.4 m	0.68
		< 3	9.4 m	
	SLP IsoFlux	≥ 11	12.1 m	0.68
		< 11	8.96 m	

Por último, se evaluó la capacidad pronóstica de los puntos de corte seleccionados para cada sistema de recuento combinada con el valor de los marcadores tumorales CEA (≥ 5 vs < 5) y CA 19.9 (≥ 35 vs < 35), observándose una ligera mejoría en la capacidad predictiva medida por el estadístico C, para la SG, SG estimada a los 24 meses y SLP tanto con CellSearch como con IsoFlux (**Tabla 26**).

5.1.10. Asociación de diferentes características clínicas con la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en el grupo 1: análisis univariante y multivariante.

Supervivencia global

En el análisis univariante la SG fue significativamente mayor en los tumores con origen en el colon izquierdo frente a los del colon derecho ($p=0.017$). La SG también fue mayor y se aproximó a la significación estadística, en las mujeres ($p=0.0579$) y en los tumores con elevación de CEA ($p=0.063$) y de CA 19.9 (0.07) frente aquellos con valor normal, respectivamente. En el análisis multivariante el sexo ($p=0.005$) y el valor de CA 19.9 ($p=0.016$), fueron los únicos factores pronósticos independientes para la SG en el grupo 1. El punto de corte seleccionado para CellSearch (3 CTC) estuvo próximo a la significación estadística ($p=0.063$) como factor pronóstico independiente para la SG en el análisis multivariante. Ver **Tabla 30**.

Tabla 30. Análisis univariante y multivariante de la supervivencia global en el grupo 1.

COVARIABLES	ANÁLISIS UNIVARIANTE			ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
SUPERVIVENCIA GLOBAL	P VALOR	HR	IC 95%	P VALOR	HR	IC 95%
KRAS (MUT vs NAT)	0,771	0,891	0,411-1,932	0,828	0,858	0,215-3,425
CTC CELLSEARCH (≥ 3 vs < 3)	0,164	1,820	0,783-4,231	0,063	6,309	0,906-43,94
CTC ISOFLUX (≥ 11 vs < 11)	0,460	1,338	0,618-2,897	0,176	0,324	0,063-1,658
EDAD (≥ 70 vs < 70)	0,457	1,351	0,611-2,983	0,110	0,388	0,122-1,240
SEXO (Mujer vs Varón)	0,057	2,231	0,978-5,090	0,005	6,736	1,782-25,46
LATERALIDAD (Derecho vs Izquierdo)	0,017	2,673	1,192-5,995	0,696	0,782	0,228-2,684
TERAPIA BIOLÓGICA (Sí vs No)	0,908	1,047	0,480-2,285	0,128	0,313	0,070-1,395
NÚMERO DE ÓRGANOS AFECTOS (1 vs ≥ 2)	0,102	1,415	0,934-2,143	0,529	0,666	0,188-2,361
NÚMERO DE LÍNEAS DE TRATAMIENTO (1 vs ≥ 2)	0,147	1,334	0,903-1,971	0,256	0,468	0,126-1,736
CEA (≤ 5 vs > 5)	0,063	2,541	0,949-6,802	0,422	2,166	0,329-14,28
CA 19.9 (≤ 35 vs > 35)	0,070	2,154	0,938-4,948	0,016	5,461	1,370-21,77

CEA: antígeno carcinoembrionario; CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CTC: células tumorales circulantes; MUT: mutado; NAT: nativo. Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

Supervivencia libre de progresión

El análisis multivariante, los puntos de corte seleccionados para CellSearch (CTC 3) ($p=0.005$) y para IsoFlux (CTC 11) ($p=0.002$), el sexo (0.000...), el número de líneas de tratamiento recibidas y el valor del CA 19.9, fueron factores pronósticos independientes para la supervivencia libre de progresión en el grupo 1. Ver **Tabla 31**.

Tabla 31. Análisis univariante y multivariante de la supervivencia libre de progresión en el grupo 1.

COVARIABLES	ANÁLISIS UNIVARIANTE			ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
	P VALOR	HR	IC 95%	P VALOR	HR	IC 95%
KRAS (MUT vs NAT)	0,360	0,704	0,331-1,495	0,232	2,585	0,544-12,29
CTC CELLSEARCH (≥ 3 vs < 3)	0,743	1,153	0,492-2,706	0,005	22,954	2,583-204
CTC ISOFLUX (≥ 11 vs < 11)	0,433	0,739	0,347-1,573	0,002	0,051	0,008-0,333
EDAD (≥ 70 vs < 70)	0,675	1,173	0,556-2,475	0,210	0,479	0,151-1,514
SEXO (Mujer vs Varón)	0,356	1,431	0,668-3,065	0,000	13,023	3,141-54
LATERALIDAD (Derecho vs Izquierdo)	0,087	1,965	0,906-4,262	0,185	0,396	0,100-1,560
TERAPIA BIOLÓGICA (Sí vs No)	0,261	1,529	0,729-3,211	0,862	1,136	0,270-4,786
NÚMERO DE ÓRGANOS AFECTOS (1 vs ≥ 2)	0,258	1,324	0,814-2,154	0,302	0,505	0,138-1,847
NÚMERO DE LÍNEAS DE TRATAMIENTO (1 vs ≥ 2)	0,511	1,143	0,767-1,704	0,002	0,136	0,040-0,466
CEA (≤ 5 vs > 5)	0,204	1,804	0,726-4,484	0,073	6,386	0,842-48,43
CA 19.9 (≤ 35 vs > 35)	0,115	1,934	0,852-4,391	0,008	7,121	1,684-30,11

CEA: antígeno carcinoembrionario; CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9; CTC: células tumorales circulantes; MUT: mutado; NAT: nativo. Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos ($p<0.05$) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

5.1.11. Asociación del punto de corte de CTC con características clínicas.

No hubo diferencias en el porcentaje de casos en función del punto de corte de CTC con CellSearch® ni con IsoFlux™ en función de la lateralidad del tumor primario (colon izquierdo vs colon derecho) en el grupo 1 (**Tabla 32 y Figura 65**).

CellSearch® CTC ≥ 3 no fue predictivo del estatus de KRAS, de los niveles de CEA y CA 19.9, del sexo, de la edad y tampoco para la presencia de metástasis pulmonares o hepáticas. Sin embargo, los pacientes con CellSearch® ≥ 3 CTC, presentaron más frecuentemente ≥ 3 localizaciones metastásicas frente a aquellos con < 3 CTC ($p=0.038$). IsoFlux™ CTC ≥ 11 no fue predictivo del estatus de KRAS, de los niveles de CEA, del sexo, de la edad, ni con el número de órganos afectados ni el tipo de metástasis, pero sí se asoció con más frecuencia con niveles de CA 19.9 elevados (CTC ≥ 11 vs < 11 : 69.2% vs 29.4%, $p=0.03$) y con un tiempo más corto entre el diagnóstico del cáncer de colon y la extracción de CTC (CTC < 11 vs ≥ 11 : 13.4 vs 10.3 meses, $p=0.046$) (**Figura 65 y Tabla 32**).

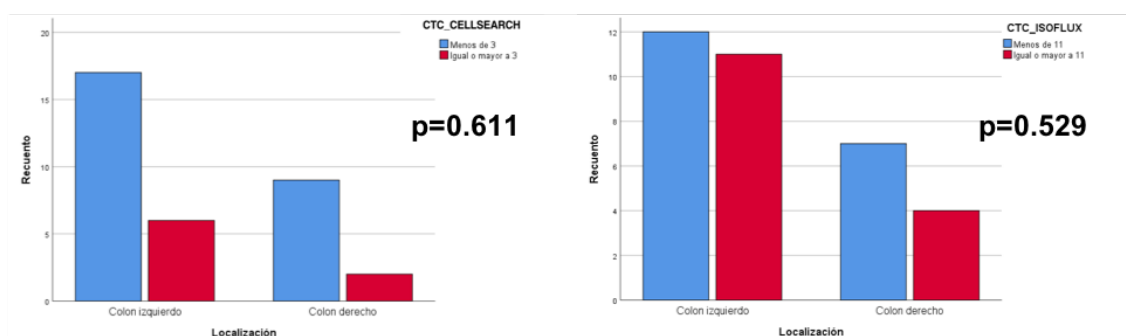


Figura 65. Número de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario y del punto de corte para cada sistema de recuento en el grupo 1. No hubo diferencias estadísticamente significativas ni con CellSearch ($p=0.611$) ni con IsoFlux ($p=0.529$). IsoFlux detectó con mayor frecuencia que CellSearch CTC por encima del punto de corte establecido. Para más información ver texto principal y **Tabla 32**. CTC: células tumorales circulantes.

Tabla 32. Asociación de diferentes características clínicas con el número de CTC según el punto de corte seleccionado para CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes del grupo 1.

GRUPO 1				CellSearch® ≥ 3 vs 3 CTC		IsoFlux™ ≥ 11 vs < 11	
KRAS Tumor primario	NATIVO		50 vs 56%	p=1.0	53.3% vs 55.6%	p=0.898	
	MUTADO		50 vs 44%		46.7% vs 44.4%		
Sexo	Varón		50 vs 38.5%	p=0.7	40.0% vs 42.1%	p=0.901	
	Mujer		50 vs 61.5%		60.0% vs 57.9%		
Edad	< 70		25% vs 50%	p=0.257	46.7% vs 42.1%	p=0.79	
	≥ 70		75% vs 50%		53.3% vs 57.9%		
Localización tumor primario	Colon izquierdo		75% vs 65%	p=0.611	73% vs 63%	p=0.529	
	Colon derecho		25% vs 32.4%		26.7% vs 36.8%		
Metástasis	≥ 3 localizaciones		37.5 vs 3.8%	P=0.038	20.0% vs 5.3%	P=0.299	
	< 3 localizaciones		62.5 vs 96.2%		80.0% vs 94.7%		
	Hepáticas	Si	87.5 vs 65.4%	P=0.385	73.3% vs 68.4%	P=1.0	
		No	12.5 vs 34.6%		26.7% vs 31.6%		
	Pulmonares	Si	37.5 vs 19.2%	P=0.355	40.0% vs 10.5%	P=0.10	
		No	62.5 vs 80.8%		60.0% vs 89.5%		
Tiempo desde el diagnóstico hasta la extracción de CTC			12.48 vs 11.9 meses	p=0.064	10.3 vs 13.4 meses	p=0.046	
CEA	≤ 5		14.3 vs 34.6%	P=0.397	35.7% vs 26.3%	P=0.71	
	> 5		85.7 vs 65.4%		64.3% vs 73.7%		
CA 19.9	≤ 35		33.3 vs 58.3%	P=0.378	30.8% vs 70.6%	P=0.03	
	> 35		66.7 vs 41.7%		69.2% vs 29.4%		

Aquellos pacientes con CellSearch® ≥ 3 CTC, presentaron más frecuentemente ≥ 3 localizaciones metastásicas frente a aquellos con < 3 CTC (p=0.038). Del mismo modo, más pacientes con IsoFlux™ CTC ≥ 11 tuvieron niveles de CA 19.9 por encima de lo normal. CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9. CEA: antígeno carcinoembrionario. CTC: células tumorales circulantes; KRAS^{MUT}: KRAS mutado; KRAS^{NAT}: KRAS nativo; QT: quimioterapia. Para más información véase el texto principal. Se resaltan **en negrita** los resultados estadísticamente significativos (p<0.05) y **en rojo** los próximos a la significación estadística.

5.1.12. Asociación de la mediana de CTC con el origen del tumor primario (izquierdo vs derecho) en los pacientes del grupo 1.

Como ya se ha mencionado, la mediana del número de CTC con CellSearch® fue 1 y con IsoFlux™ fue 8 CTC. Hubo un mayor porcentaje de pacientes con tumores de colon izquierdo con recuentos por encima de la mediana de CTC, sin ser estadísticamente significativo con CellSearch® (p=0.714) pero estando próximo a la significación en el caso de IsoFlux™ (p=0.086)(Tabla 33 y Figura 66).

Tabla 33. Asociación entre la mediana del recuento de CTC con CellSearch e IsoFlux en función de la lateralidad del tumor primario.

VARIABLE	GRUPO 1					
	CellSearch®			IsoFlux™		
Mediana de CTC	≤ 1 CTC	CI vs CD: 64.7% vs 35.3%	p=0.271	≤ 8 CTC	CI vs CD: 58.8% vs 41.2%	p=0.086
	> 1 CTC	CI vs CD: 70.6% vs 29.4%		> 8 CTC	CI vs CD: 76.5% vs 23.5%	

Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC: células tumorales circulantes; “p”: p-valor. Para más información véase el texto principal. Se resaltan en rojo los valores próximos a la significación estadística.

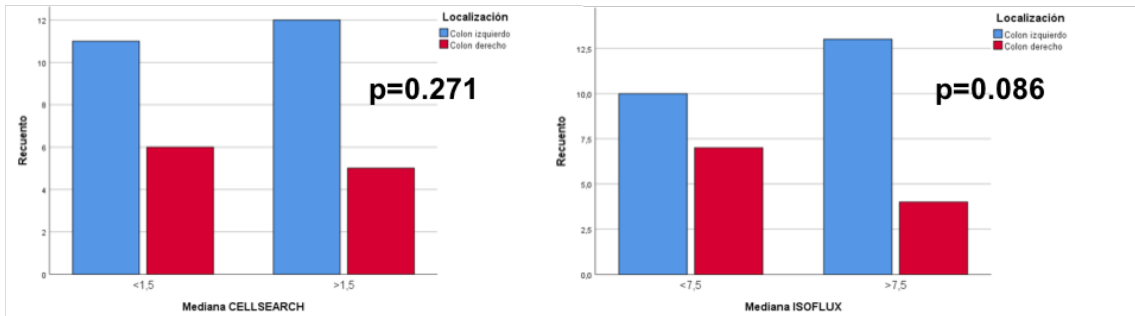


Figura 66. Número de pacientes con CTC por encima y por debajo de la mediana con CellSearch® e IsoFlux™ en función de la localización del tumor primario en el grupo 1. Para más información ver texto principal y Tabla 33. CTC: células tumorales circulantes.

5.2. Parte 2: Evaluación de diferentes métodos de análisis mutacional en ADN de CTC recuperadas con el sistema IsoFlux en pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado (estadio IV) y correlación con el tumor primario y el plasma.

5.2.1. Estatus mutacional de KRAS en el tumor primario y en CTC en pacientes con CCRm de los grupos 1 y 2.

5.2.1.1. Estatus de KRAS en el tumor primario por PCR en tiempo real (RT-PCR) (cobas® y TheraScreen®)

El estatus mutacional de KRAS en el tumor primario no se pudo determinar en un paciente del grupo 1 al no existir muestra remanente para el análisis. De los 33 casos restantes, dieciséis fueron KRAS^{NAT} y 15 fueron KRAS^{MUT}. De acuerdo al protocolo del estudio, todos los pacientes del grupo 2 tenían tumores KRAS^{NAT} (Tablas 34 y 35).

5.2.1.2. Estatus de KRAS en CTC utilizando cobas® RT-PCR and CLART® CMA multiplex PCR (mPCR)

En 17 pacientes del grupo 1 no se detectaron mutaciones en KRAS en ADN de CTC por cobas® RT-PCR, a pesar de que 6 de ellos eran KRAS^{MUT} en el tumor primario por RT-PCR. Al emplear CLART® CMA mPCR para analizar el estatus de KRAS en CTC, todos menos uno de los 8 pacientes analizados del grupo 1 fueron KRAS^{NAT} en CTC, a pesar de ser todos KRAS^{MUT} en el tumor primario por RT-PCR. Los 15 pacientes del grupo 2 cuyo ADN de CTC fue analizado con cobas® RT-PCR resultaron ser KRAS^{NAT}. Todos habían recibido terapia previa con agentes anti-EGFR en algún momento antes de la extracción de CTC. No se pudo realizar el análisis mutacional de KRAS en las CTC de estos 15 pacientes usando CLART® CMA mPCR al no existir muestra suficiente (Tablas 34 y 35).

5.2.1.3. Estatus de KRAS en el tumor primario y en CTC empleando castPCR™ y concordancia con el estatus de KRAS en el tumor primario por RT-PCR.

Se muestran en las Tabla 36 y 37 los resultados de las mutaciones encontradas por castPCR en CTC con un dCT por debajo del punto de corte establecido (21) o que, estando igual o por encima del punto de corte, se consideraron mutaciones reales por coincidir con la mutación detectada por castPCR en el tumor. En las Tablas A5 y A6 de la sección de ANEXOS se incluyen también aquellas mutaciones detectadas por castPCR con un dCt por encima del punto de corte y detectadas en una sola muestra en cada paciente, y que por tanto fueron consideradas como dudosas.

- ***Estatus de KRAS en el tumor por castPCR™***

El estatus de KRAS en el tumor por castPCR™ fue estudiado en 10 pacientes del grupo 1 y en 9 pacientes del grupo 2. En el grupo 1 se detectaron 18 mutaciones en muestras de tumor de 9 pacientes. En 4 de estos pacientes fueron estudiadas varias muestras diferentes de tumor sólido. En un paciente (HCSC-1-09) se encontró la misma mutación en el tumor primario y en una metástasis pulmonar resecada (G12V). En un segundo paciente (HCSC-1-11), se encontró la misma mutación en el tumor primario y en una metástasis hepática resecada (G12D). En este paciente se encontraron las mismas 2 mutaciones en la biopsia por endoscopia del tumor primario (G12D (26), G13D (22) y en la pieza de hemicolectomía (G12D (18), G13D (20)). Aunque el dCt para estas dos mutaciones estuvo por encima del punto de corte establecido en la biopsia de endoscopia, probablemente se debió a la escasez de muestra. En un tercer paciente (HCSC-1-12) el perfil mutacional fue coincidente entre el tumor primario del diagnóstico inicial y el de la recaída local que se produjo más de 1 año después. En este caso hubo coincidencia en las 3 mutaciones detectadas (G12S, G12D, G12C). Aunque el dCt no estuvo en todos los casos por debajo del punto de corte para considerarlas indudablemente mutaciones reales, el hecho de que se detectaran exactamente las 3 mismas mutaciones en 2 muestras diferentes, sugiere que se trata de mutaciones verdaderas en un tumor biológicamente heterogéneo, y no de un error de la técnica (Tablas 34 y 35). Ver Figuras 67-70.

- ***Estatus de KRAS en CTC por castPCR™***

El estatus de KRAS en CTC por castPCR™ fue estudiado en 15 pacientes del grupo 1 y en 10 pacientes del grupo 2. **En el grupo 1**, en los 15 pacientes estudiados por castPCR™ en las CTC, se detectaron 9 mutaciones en 8 pacientes, en 4 loci diferentes (G12A (2), G13D (5), G12D (1), G12V (1), siendo la mutación G13D la más común en las CTC en este grupo (Figura 67). **En el grupo 2**, de los 10 pacientes estudiados por castPCR™ en las CTC, se detectaron 4 mutaciones en 3 pacientes, en 2 loci diferentes (G12A (3), G13D (1)) siendo la mutación G12A la más común en las CTC en este grupo (Figura 67). Véanse Tablas 34-36.

- ***Concordancia del estatus de KRAS por RT-PCR en el tumor primario y por castPCR™ en CTC***

Hubo discordancia respecto al estatus de KRAS (mutado vs nativo) entre el tumor y las CTC en 5 casos del grupo 1 y 3 casos del grupo 2 (Tablas 34-36). Hubo 10 casos concordantes en KRAS en el grupo 1 y 7 casos en el grupo 2. De los 6 casos KRAS^{MUT} concordantes entre el tumor y las CTC en el grupo 1 se detectó la misma mutación en 1 de ellos (G12D). Por definición, todos los pacientes del grupo 2 eran KRAS^{NAT} por RT-PCR. Por castPCR fueron KRAS^{NAT} 5 de los 10 casos testados. Véase Tablas 34-36.

- **Concordancia del estatus de KRAS por castPCRTM en el tumor primario y en CTC**

El estatus de KRAS en el tumor fue estudiado mediante castPCRTM en 10 pacientes del grupo 1 y en 9 pacientes del grupo 2. El estatus de KRAS por castPCRTM en el tumor y en CTC en el grupo 1 fue concordante en 7/10 pacientes (70%), siendo 6 casos KRAS^{MUT} y tratándose de la misma mutación en 4 de ellos (G12A (1), G12D (1), G13D (2)). De los 9 pacientes del grupo 2 estudiados mediante castPCRTM en el tumor y en las CTC, el estatus de KRAS fue concordante en 6 pacientes (67%). De los 4 pacientes KRAS^{MUT} en el tumor por castPCRTM, 2 de ellos también lo fueron en CTC (50%), y se detectó la misma mutación en uno de ellos (G13D). De las CTC la mutación G12A fue la más frecuente (75%). Además, en 1 paciente, se detectaron dos mutaciones sincrónicas en CTC (G12A y G13D). Véanse Figuras 67-71 y Tablas 34-36.

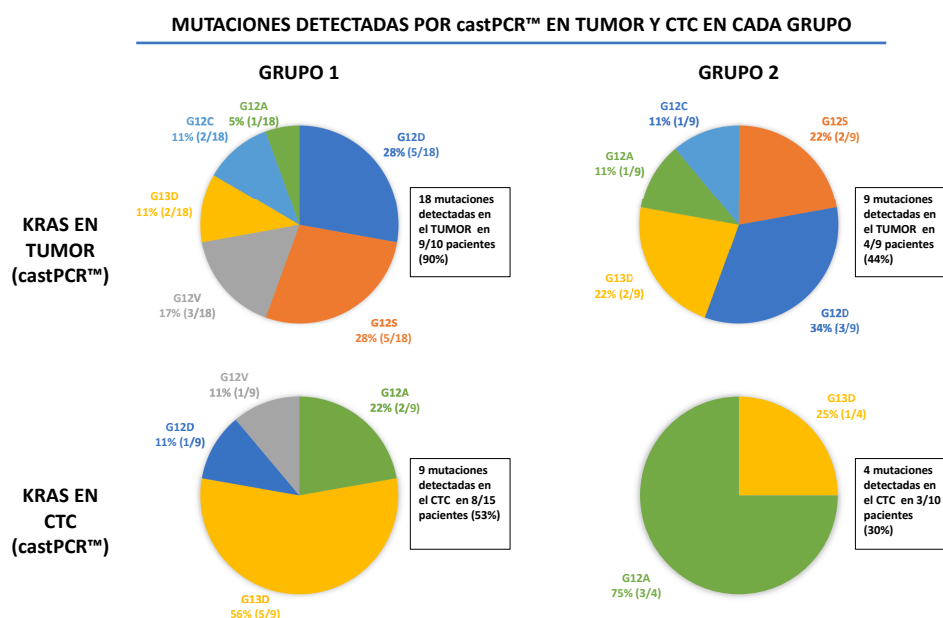


Figura 67. Tipo de mutación en KRAS detectada por castPCRTM en el Tumor y en las CTC en los pacientes de los grupos 1 y 2. Para más información véase texto principal. castPCR: competitive allele specific Taqman PCR; CTC: células tumorales circulantes.

- **Resumen de la concordancia del estatus de KRAS entre el tumor primario y las CTC por diferentes técnicas en los grupos 1 y 2.**

En las **Figuras 65-70** y en la **Tabla 33** se resumen los casos estudiados en el tumor y en las CTC por cada técnica en cada grupo, así como el nivel de coincidencia en el estatus de KRAS entre las diferentes técnicas en el tumor y en las CTC, y entre el tumor y las CTC.


Tabla 34. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 1.

GRUPO 1	RECuento DE CTC		KRAS TUMOR		KRAS CTC [†]		
Paciente	CellSearch®	IsoFlux™	RT-PCR*	castPCR™	RT-PCR*	CLART® CMA mPCR	castPCR™
HCSC-1-01	4	36	NATa	NAT	NATa	MI	NAT
HCSC-1-02	2	0	NATa	MI	MI	MI	MI
HCSC-1-03	78	203	NATa	G12A (22)	NATa	MI	G12A (17)
HCSC-1-04	2	395	NATa	G12V (17), G13D (21)	NATa	MI	G13D (31)
HCSC-1-05	0	6	G12Sb	G12S (10), G12D (17)	NATa	NAT	NAT
HCSC-1-06	0	9	G12Db	MI	NATa	NAT	G13D (18)
HCSC-1-08	1	1	G12Db	G12D (16)	NATa	NAT	G12D (25)
HCSC-1-09	2	60	MUTa	TP: G12V (10) G12D (15) MTX PULM: G12V (7)	NATa	MI	G13D (12)
HCSC-1-10	0	0	NATa	G12S (20)	NATa	MI	NAT
HCSC-1-11	1	4	MUTa	TP1 (SIGMOIDEC): G12S (20) TP2 (ENDOSC): G12V (14), G13D (22), G12D (26), G12C (19) TP2 (HEMICOLEC): G12V (8), G13D (20), G12D (18) MTX HEP: G12D (21)	NATa	MI	G13D (33)
HCSC-1-12	5	48	G12Cb	TP: G12S (25), G12D (20), G12C (6) RECAÍDA LOCAL: G12S (22), G12D (21),	NATa	MI	NAT

				G12C (6)			
HCSC-1-15	4	48	G12Db	G12S (9)	NATa	NAT	G12A (11), G13D (19)
HUPH-1-21	0	4	NATa	MI	-	MI	NAT
HUPH-1-22	0	4	MUTa	MI	NATa	NAT	NAT
HUPH-1-24	1	0	MUTa	MI	NATa	NAT	G12V (9)
HUPH-1-28	2	5	NATa	MI	NATa	MI	NAT
HCSC-1-07	0	2	MI	MI	MI	MI	MI
HCSC-1-13	1	23	G12Db	MI	NATa	MI	MI
HCSC-1-14	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI
HCSC-1-16	0	23	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-17	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-18	3	419	MUTa	MI	NATa	MUT	MI
HUPH-1-19	1	2	MUTa	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-20	2	1	NATa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-23	0	11	MUTa	MI	NATa	NAT	MI
HUPH-1-25	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-26	10	408	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-27	2	10	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-29	1	0	MUTa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-30	4	312	MUTa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-31	32	56	MUTa	MI	MI	MI	MI
HURSC-1-32	1	62	NATb	MI	NATa	MI	MI
HURSC-1-33	1	1	NATb	MI	MI	MI	MI
HURSC-1-34	0	39	NATb	MI	MI	MI	MI

ENDOSC: endoscopia; MI: MI: muestra insuficiente para poder llevar a cabo la determinación; HEMICOLEC: hemicolectomía; MTX HEP: metástasis hepática; MUT: mutado; NAT: nativo; TP: tumor primario; TP1: primer tumor primario 1; TP2: segundo tumor primario;

*RT-PCR: Se emplearon Cobas (a) o TheraScreen (b) en tumor primario y Cobas (a) en CTC.

 El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema IsoFlux™

Se muestran primero los casos estudiados por castPCR en CTC y a continuación los restantes.

El estudio de KRAS en Tumor, se realizó siempre en el tumor primario (TP), salvo en algún caso en que se realizó también en la metástasis o recidiva local y en cuyo caso así se especifica.

En los casos estudiados por castPCR, se especifica entre paréntesis () el dCt de la mutación concreta. Se consideraron mutaciones reales aquellas con un dCt < 21 o que teniendo un dCt > 21, fueron detectadas en varias muestras de un mismo paciente. Las mutaciones con un dCt > 21 y solo detectadas en 1 muestra del paciente, se consideraron falsos positivos o en el mejor de los casos, dudosas, y no se muestran en esta tabla. Pueden consultarse en la Tabla en la sección de ANEXOS.

Se resaltan en **negrita** los casos KRAS mutado en tumor sólido y CTC por cualquier técnica. Se resaltan en **rojo** los casos en que se detectó la misma mutación en tumor y en CTC por cualquier técnica.

Tabla 35. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 2.

GRUPO 2	RECuento DE CTC		KRAS TUMOR		KRAS CTC [†]		
Paciente	CellSearch®	IsoFlux™	RT-PCR*	castPCR™	RT-PCR*	CLART® mPCR	CMA castPCR™
HCSC-2-02	0	-	NATa	NAT	NATa	-	NAT
HCSC-2-03	1	-	NATb	NAT	MI	-	NAT
HCSC-2-04	0	-	NATb	NAT	NATa	-	NAT
HCSC-2-05	1	-	NATa	NAT	NATa	-	NAT
HCSC-2-06	2	-	NATa	TP: G12A (8), G12D (18) MTX HEP: G12D (15)	NATa	-	NAT
HCSC-2-07	4	-	NATa	G12S (17)	NATa	-	NAT
HCSC-2-08	1	193	NATa	NAT	NATa	-	G12A (12)
HCSC-2-09	1	296	NATa	G12S (18), G13D (18), G12D (18), G12C (15)	NATa	-	G12A (19)
HUPH-2-20	2	-	NATa	G12D (19), G12S (21), G13D (30)	NATa	-	G12A (11), G13D (12)
HUPH-2-21	17	-	NATb	MI	NATa	-	NAT
HCSC-2-01	-	65	NATa	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-10	1	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-11	4	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-12	12	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-13	7	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-14	1	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-15	1	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-16	0	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-17	6	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-18	0	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-19	0	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-22	1	-	NATb	MI	MI	-	MI

(-): No realizado al no incluirse esta determinación en el protocolo; MI: muestra insuficiente para poder llevar a cabo la determinación; MTX PULM: metástasis pulmonar; NAT: nativo; TP: tumor primario.

*RT-PCR: Se emplearon Cobas (a) o TheraScreen (b) en tumor primario y Cobas (a) en CTC.

[†]El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema *IsoFlux™*

Se muestran primero los casos estudiados por castPCR en CTC y a continuación los restantes.

El estudio de KRAS en Tumor, se realizó siempre en el tumor primario (TP), salvo en algún caso en que se realizó también en la metástasis o recidiva local y en cuyo caso así se especifica.

En los casos estudiados por castPCR, se especifica entre paréntesis () el dCt de la mutación concreta. Se consideran mutaciones reales aquellas con un dCt < 21 o que teniendo un dCt > 21, se detectaron en varias muestras de un mismo paciente. Aquellas mutaciones aisladas y con un dCt > 21 se consideraron dudosas y no se muestran esta tabla. Pueden consultarse en la Tabla en la sección de ANEXOS.

Se resaltan en **negrita** los casos KRAS mutado en tumor sólido y CTC por cualquier técnica. Se resaltan en **rojo** los casos en que se detectó la misma mutación en tumor y en CTC por cualquier técnica.

Tabla 36. Concordancia del estatus de KRAS y tipo de mutación entre el tumor primario y las CTC con cada método de análisis en el grupo 1 y en el grupo 2.

CONCORDANCIA ESTATUS (NATIVO + MUTADO)				
	KRAS (TUMOR VS CTC)			
	RTPCR ^{TUMOR} vs RTPCR ^{CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs PCR ^{m CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}	castPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}
Grupo 1	0% (0/17)	12.5% (1/8)	67% (10/15)	70% (7/10)
Grupo 2	100% (15/15)	-	70% (7/10)	67% (6/9)

CONCORDANCIA ESTATUS (SÓLO ESTATUS MUTADO)				
	KRAS (TUMOR VS CTC)			
	RTPCR ^{TUMOR} vs RTPCR ^{CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs PCR ^{m CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}	castPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}
Grupo 1	0% (0/13)	12.5% (1/8)	67% (6/9)	67% (6/9)
Grupo 2	-	-	-	50% (2/4)

CONCORDANCIA POR TIPO DE MUTACIÓN								
	KRAS (TUMOR & CTC)							
	RTPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{TUMOR}		RTPCR ^{TUMOR} vs RTPCR ^{CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs PCR ^{m CTC}	RTPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}		castPCR ^{TUMOR} vs castPCR ^{CTC}	
Grupo 1	50% (3/6)	G12S (1), G12D (1), G12C (1)	0% (0/6)	NA	20% (1/5)	G12D (1)	57% (4/7)	G12A (1), G12D (1), G13D (2)
Grupo 2	NA		NA	NA	NA		25% (1/4)	G13D (1)

(-): No realizado o no aplica; CTC: células tumorales circulantes, NAT: nativo. castPCR: competitive allele specific Taqman PCR, PCR^m: CLART CMA multiplex PCR, RT-PCR: PCR en tiempo real.

RT-PCR: Se emplearon Cobas o TheraScreen® en tumor primario y Cobas en CTC.

El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema IsoFlux™

**En 3 de los 6 casos mutados en el Tumor por RT-PCR, se empleó Cobas, por lo que se desconoce el locus de la mutación.

***De los 10 casos del grupo 1 estudiados por castPCR™ en Tumor y en CTC, hubo 7 casos con estatus KRAS concordante. De los 9 casos KRAS^{MUT} por castPCR™ en Tumor, 6 fueron KRAS^{MUT} por castPCR™ en CTC. En 4 de ellos se detectó la misma mutación en las dos muestras. Para más información ver texto principal y Tabla 35.

****De los 9 casos del grupo 2 estudiados por castPCR™ en Tumor y en CTC, hubo 4 casos con estatus KRAS nativo concordante y 2 casos con estatus KRAS mutado concordante, en uno de los cuales se detectó la misma mutación en las dos muestras. Para más información ver texto principal y Tabla 36.

Se resaltan en **rojo** los casos en los que se detectó la misma mutación entre las dos muestras estudiadas según cada caso.

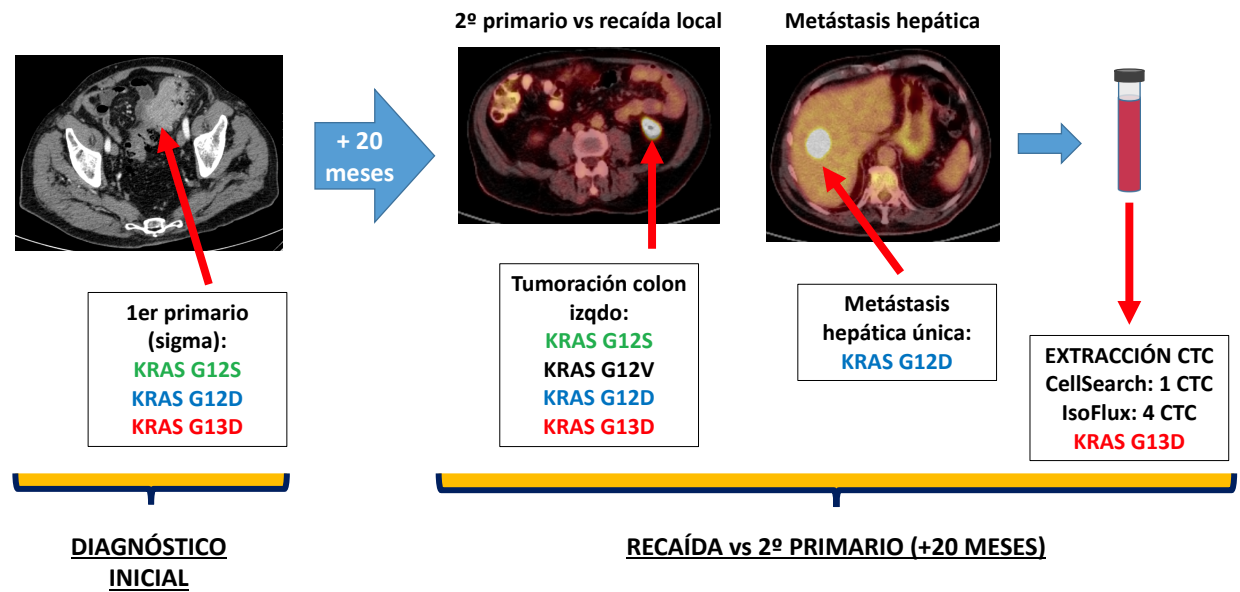


Figura 68. Perfil mutacional de KRAS en tumor primario, recidiva local vs 2º primario, metástasis hepática y CTC. Tumor primario en sigma intervenido mediante sigmoidectomía + anastomosis término-terminal, pT3 N0 (0/27), estadio II sin factores de riesgo, por lo que no recibió tratamiento adyuvante (izquierda). Recaída vs 2º primario en colon descendente (próximo a zona de cicatriz quirúrgica) y aparición sincrónica de dos metástasis hepáticas en LHD 20 meses después del diagnóstico inicial (centro). Extracción de CTC antes de iniciar la quimioterapia neoadyuvante con Folfiri-Bevacizumab (derecha). Tras respuesta parcial y metabólica en colon e hígado, se realizó una hepatectomía derecha y en un segundo tiempo -a los 2 meses- una hemicolectomía izquierda. Se encuentra libre de enfermedad 4 años después de esta última cirugía. El perfil mutacional de KRAS demuestra coincidencia para algunas de las mutaciones entre los 2 tumores del colon, la metástasis hepática y las CTC. La similitud del perfil mutacional de los 2 tumores primarios, sugiere que el 2º tumor en el colon se trata, en realidad, de una recidiva local. CTC: células tumorales circulantes; LHD: lóbulo hepático derecho. Las mutaciones en KRAS fueron estudiadas mediante castPCR en CTC recuperadas con IsoFlux.

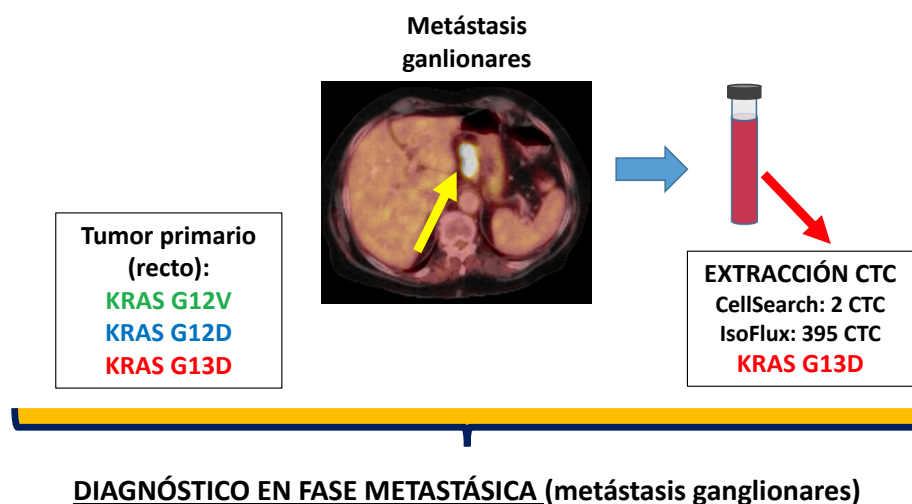


Figura 69. Perfil mutacional de KRAS en tumor primario y en CTC. Se detectaron 3 mutaciones en KRAS en el tumor primario mediante castPCR (G12V, G12D, G13D). Se detectaron 2 CTC con CellSearch y 395 con IsoFlux. En CTC recuperadas con IsoFlux y cuyo ADN fue analizado mediante castPCR se detectó una de las mutaciones detectadas en el tumor primario, la mutación en KRAS G13D. CTC: células tumorales circulantes.

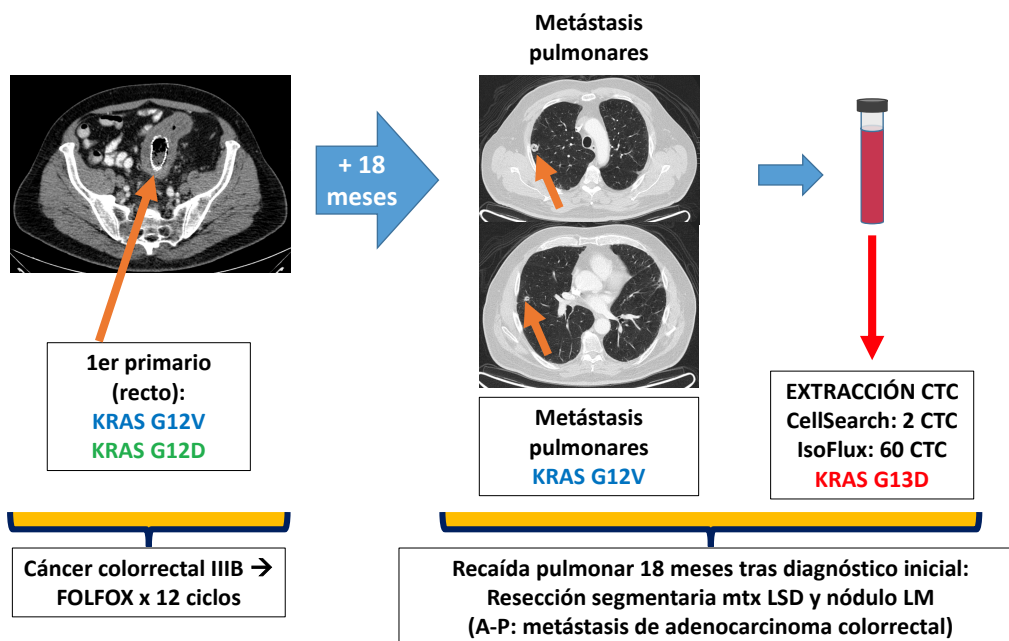


Figura 70. Perfil mutacional de KRAS por castPCR en tumor primario, metástasis pulmonares y en CTC. Se detectaron 2 mutaciones en KRAS en el tumor primario (G12V, G12D), una de las cuales fue detectada en la pieza quirúrgica de resección de las metástasis pulmonares (G12V). Se detectaron 2 CTC con CellSearch y 60 con IsoFlux. En CTC recuperadas con IsoFlux se detectó la mutación KRAS G13D, no detectada previamente en el tumor primario ni en las metástasis pulmonares. CTC: células tumorales circulantes.

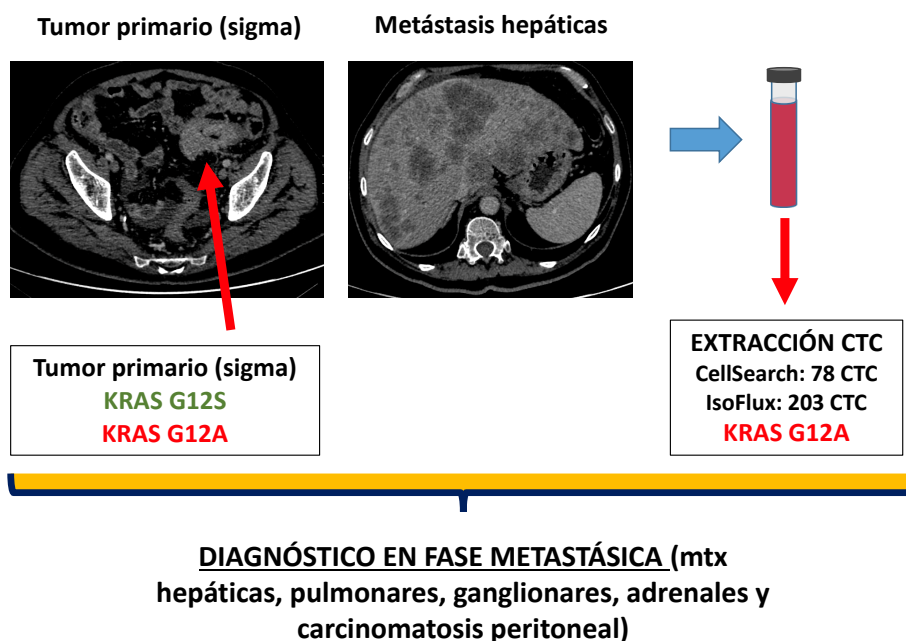


Figura 71. Perfil mutacional de KRAS por castPCR en tumor primario y en CTC. Se detectaron 2 mutaciones en KRAS en el tumor primario (G12S, G12A). Se detectaron 78 CTC con CellSearch y 203 con IsoFlux. En CTC recuperadas con IsoFlux se detectó una de las mutaciones (KRAS G12A) detectada en el tumor primario. CTC: células tumorales circulantes.

5.2.2. Detección mediante BEAMing de mutaciones en KRAS en mezclas de ADN de líneas celulares KRAS^{NAT} y KRAS^{MUT}.

Se emplearon concentraciones diferentes de ADN extraído de células de la línea KRAS mutada (KRAS^{MUT}) de cáncer de mama MDA-MB-231 y de la línea celular de cáncer de próstata KRAS nativa (KRAS^{NAT}) PC3, con el fin de testar la capacidad de detección de la mutación por BEAMing en ADN de CTC. Se emplearon diferentes mezclas de células KRAS^{MUT} con células KRAS^{NAT}: 5 células KRAS^{MUT} diluidas en entre 100 y 5000 células KRAS^{NAT} (proporción entre 5% y 0.1%), 10 células KRAS^{MUT} diluidas en entre 100 a 5000 células KRAS^{NAT} (proporción entre 10 y 0.2%), 3 células KRAS^{MUT} diluidas en entre 20 a 1000 células KRAS^{NAT} (proporción entre 5 y 0.1%), y por último 1 célula KRAS^{MUT} diluida en entre 20 a 1000 células KRAS^{NAT} (proporción entre 5 y 0.1%). BEAMing detectó la mutación en KRAS con el equivalente de 10 y 5 células KRAS^{MUT} pero no con 3 y 1 células (Tabla 37 y Figura 72).

5.2.3. Detección mediante BEAMing de CTC KRAS^{MUT} en estudios de “spike-in” empleando líneas celulares KRAS^{MUT} y KRAS^{NAT}.

Se realizaron estudios de “spike-in” empleando CTC de la línea celular KRAS^{MUT} MDA-MB-231 en sangre de controles sanos. Las CTC fueron recuperadas con IsoFlux™ y posteriormente purificadas con CellSelector™, quedando únicamente celularidad KRAS mutada en la muestra resultante. BEAMing detectó la mutación en KRAS con 50, 20, 10, 6, 4, 2 y 1 células (Fracción alélica mutada (FAM) media (\pm DS): 23.8% \pm 3.8) (Tabla 37 y Figura 72).

Tabla 37. Estudios de KRAS mediante BEAMing empleando líneas celulares.

Muestra	Células KRAS ^{MUT}	Células KRAS ^{NAT}	Proporción células KRAS ^{MUT} /KRAS ^{NAT}	Resultado software BEAMing	FAM BEAMing	Interpretación final
Mezcla ADN	5	100	5%	"Low DNA"	0.079%	NMD
	5	500	1%	MUTADO	0.43%	MUTADO
	5	500	1%	"Low DNA"	0.262%	POSIBLE MUTADO
	5	5000	0.1%	NO MUTADO	0.013%	NMD
Mezcla ADN	10	100	10	"Low DNA"	0.728%	POSIBLE MUTADO
	10	500	2	MUTADO	0.338%	MUTADO
	10	5000	0.2	MUTADO	0.041%	MUTADO
Mezcla ADN	3	60	5	"Low DNA"	0	NMD
	3	3000	0.1	"Low DNA"	0.009%	NMD
Mezcla ADN	1	20	5	"Low DNA"	0	NMD
	1	1000	0.1	"Low DNA"	0.009%	NMD
CellCelector	50	0	50	MUTADO	22.9%	MUTADO
	20	0	20	"Low DNA"	26.2%	MUTADO
	10	0	10	"Low DNA"	26.8%	MUTADO
	6	0	6	"Low DNA"	18.8%	MUTADO
	4	0	4	MUTADO	19.6%	MUTADO
	2	0	2	"Low DNA"	29.25%	MUTADO
	1	0	1	"Low DNA"	22.93%	MUTADO
CellCelector (HCUSC09)	15	0	15	"Low DNA"	11.38%	MUTADO

Se empleó el ADN procedente de concentraciones diferentes de células KRAS^{MUT} (línea MDA-MB-231) y KRAS^{NAT} con el fin de demostrar la viabilidad de la detección de la mutación por BEAMing y de establecer su límite de detección. Asimismo, se llevaron a cabo estudios de "spiking" con diferentes concentraciones de CTC de la línea KRAS^{MUT} diluidas en sangre de controles sanos. Las CTC fueron recuperadas con IsoFlux y posteriormente la muestra fue purificada con el sistema CellCeletor consiguiendo una pureza de CTC del 100% al separar la totalidad del componente NO-CTC. BEAMing detectó la mutación en KRAS en todas las muestras purificadas por CellCeletor, incluyendo el caso de un paciente (HUSC09) en el que BEAMing detectó una mutación en KRAS Exón 2 Codón 13 (FAM 11.38%) en CTC (**Ver texto principal y Figuras 72 y 74**). CTC: células tumorales circulantes, NMD: no mutación detectada.

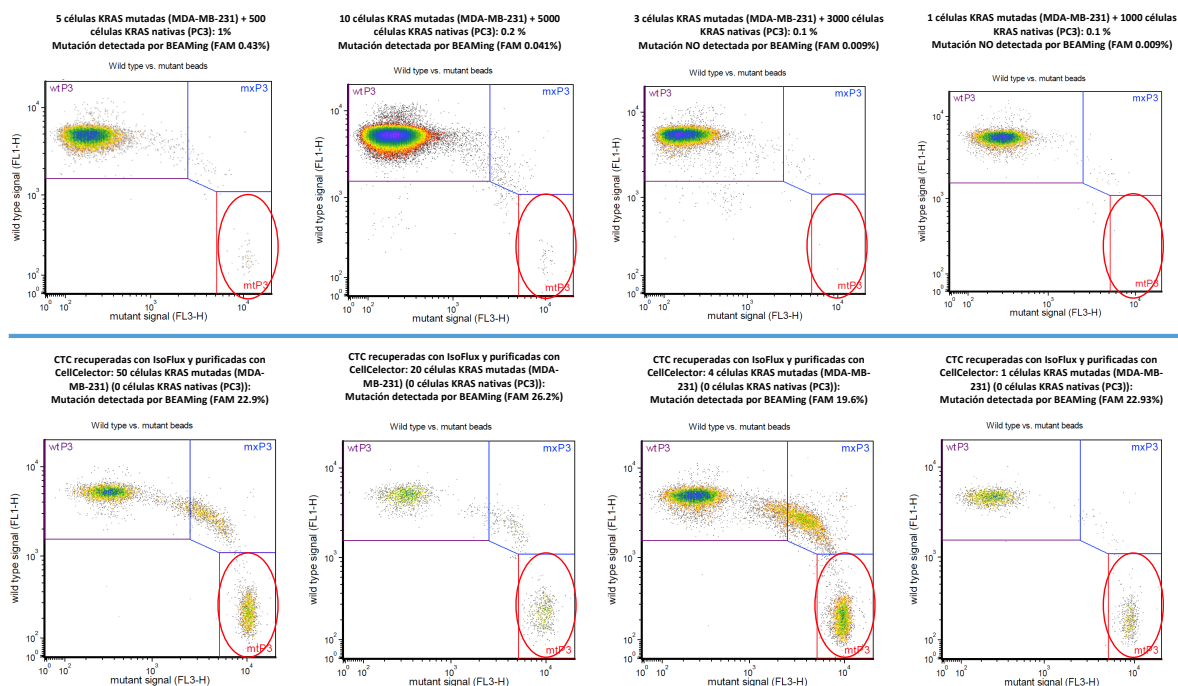


Figura 72. Gráficos de los resultados del análisis por BEAMing en líneas celulares y en CTC obtenidas con IsoFlux y purificadas con CellCelector en estudios de “spike-in”. En la fila superior se muestran los resultados tras el análisis del ADN procedente de proporciones diferentes de células KRAS^{MUT} (línea MDA-MB-231) y KRAS^{NAT} con el fin de demostrar la viabilidad de la detección de la mutación por BEAMing. En la fila inferior se muestran los resultados de los estudios de “spiking” con diferentes concentraciones de CTC de la línea KRAS^{MUT} diluidas en sangre de controles sanos. Las CTC fueron recuperadas con IsoFlux y posteriormente la muestra fue purificada con el sistema CellCelector consiguiendo una pureza de CTC del 100% al separar las CTC del componente celular NO-CTC. BEAMing detectó la mutación en KRAS en todas las muestras purificadas por CellCelector, y lo hizo detectando una FAM elevada en todos los casos, incluyendo el caso de un paciente (HUSC09) en el que BEAMing detectó una mutación en KRAS Exón 2 Codón 13 (FAM 11.4%) en CTC (Ver texto principal, Tabla 41 y Figura 72). El círculo rojo señala la fracción mutada en cada gráfico. CTC: células tumorales circulantes.

5.2.4. Concordancia de las mutaciones en RAS en tumor primario, plasma y ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™ en pacientes con cáncer colorectal metastásico del grupo 3.

Se trata de un estudio actualmente en curso en el que está previsto reclutar un total de 70 pacientes. Entre enero de 2017 y abril de 2019 se incluyó a N=32 pacientes, de los cuales 29 fueron válidos para el recuento de CTC y su caracterización molecular. Se presentan aquí los resultados del recuento de CTC, y resultados preliminares del análisis mutacional de RAS en ADNtc y en ADN de CTC (**Figura 73**).

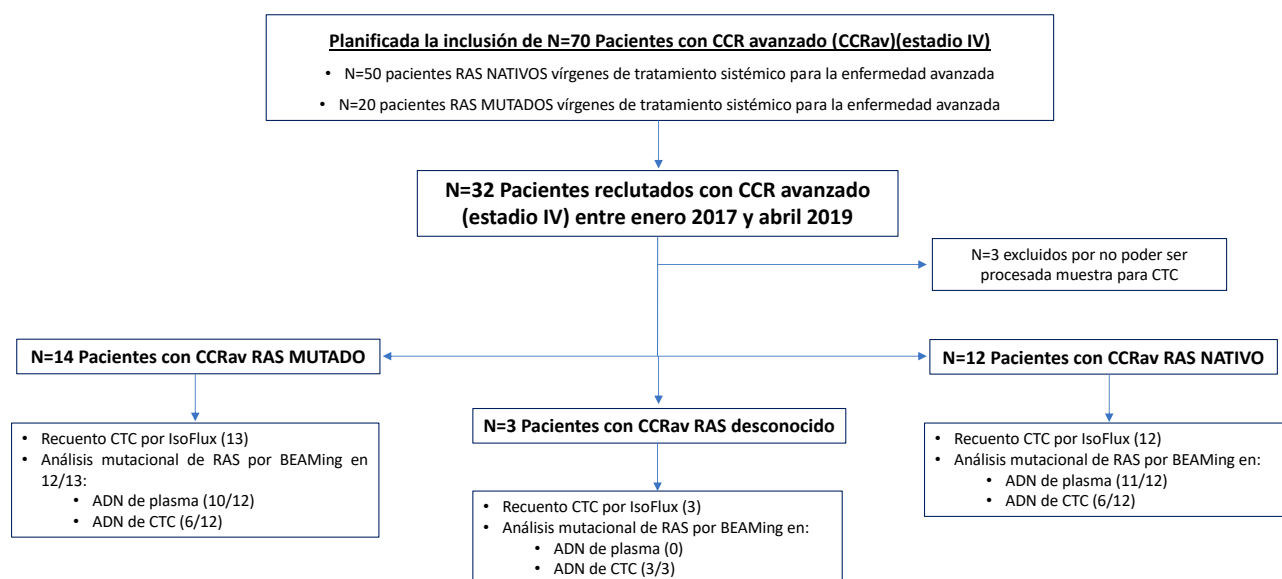


Figura 73. Diagrama de flujo con los pacientes planificados para su inclusión en el grupo 3, y los incluidos hasta la fecha; CCRav: cáncer colorrectal avanzado; CTC: células tumorales circulantes.

La distribución por sexos fue de 16 varones y 6 mujeres. La mediana de edad en el momento de la extracción de CTC fue de 69 años (rango min-max: 41-82). La mayoría había debutado en fase avanzada (62%), siendo las metástasis hepáticas, pulmonares y ganglionares las más frecuentes en esos pacientes (54%, 38.5% y 15.4%, respectivamente). El 71.4% fue sometido a resección quirúrgica del tumor primario. De los 8 pacientes diagnosticados en etapas II o III, el 75% recibió quimioterapia adyuvante. En el momento de la extracción de CTCs, el 76.2%, 38.1%, 23.8% y el 9.5% presentaban metástasis hepáticas, pulmonares, ganglionares y peritoneales, respectivamente. El 69% y el 46.1% tenían el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) por encima de sus valores normales (>5 ng/ml y >35 U/ml), respectivamente. El estatus de RAS en el tumor primario, se pudo obtener en 19 de 22 pacientes. De estos, 9 fueron RAS nativo (RAS^{NAT}) y 10 fueron RAS mutado (RAS^{MUT}). Las características clínico-patológicas se resumen en la **Tabla 38**.

Tabla 38. Resumen de las características de los pacientes.

VARIABLE		N=29			
Sexo (varón:mujer)		16:6			
Edad en extracción de CTC (mediana)		69 (41-82)			
Estadio al diagnóstico según AJCC 8ª Edición (2017)		I: 0	II: 1/21 (4.8%)	III: 7/21 (33.3%)	IV: 13/21 (61.9%)
Localización del tumor primario	Colon izquierdo	7/20 (35%)			
	Colon derecho	7/20 (35%)			
	Recto	6/20 (30%)			
Resección del tumor primario		15/21 (71.4%)			
Tipo histológico	Mucinoso	4.8% (1/21)			
	Células en anillo de sello	4.8% (1/21)			
	Sin especificar (NOS)	90.5% (19/21)			
Otras características anatómo-patológicas tumor primario	Ulcerado	6/19 (31.6%)			
	Perforado	3/20 (15%)			
	Infiltración linfovenosa	9/12 (75%)			
Quimioterapia adyuvante (sólo diagnosticados en fase localizada)		75% (6/8)			
Radioterapia pre-cirugía (Rectos)		33% (2/6)			
KRAS (tumor primario)	Nativo	9/19 (47.4%)			
	Mutado	10/19 (52.6%)			
Nº de CTC IsoFlux (mediana)		3 (0-15)			
Localización de las metástasis en CTC	Hígado	16/21 (76.2%)			
	Pulmón	8/21 (38.1%)			
	Ganglios linfáticos	5/21 (23.8%)			
	Peritoneo	2/21 (9.5%)			
	Local	1/21 (4.8%)			
	Otras (localización)	2/21 (9.5%) (muscular, derrame pericárdico)			
CEA > 5 en extracción CTC		69.2% (9/13)			
CA 19.9 > 35 en extracción CTC		46.2% (6/13)			

Todos los pacientes eran vírgenes de tratamiento para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC. **AJCC:** American Joint Committee on Cancer, **QT:** quimioterapia, **CTC:** células tumorales circulantes, **NOS:** not otherwise specified. **En caso de no disponer de datos para todos los pacientes, se indica el porcentaje y el número exacto de pacientes en que se pudo evaluar cada variable.**

5.2.4.1. Recuento de CTC y concordancia entre el estatus de RAS en el tumor primario, en plasma y en CTC.

Se realizó el recuento de CTC en 29 pacientes, detectándose una mediana de CTC de 3 (rango Min-max: 0-15). Hubo 4 casos en los que no se detectaron CTC y 10 casos en los que sólo se detectó 1 CTC. En 11 casos se detectaron ≥ 4 CTC. Se pudo conocer el estatus de RAS en el tumor primario en 25 casos, siendo 13 RAS mutado y 12 RAS nativo. El estatus de RAS en plasma mediante BEAMing se pudo testar en 23 pacientes, resultando 10 RAS mutado y 13 RAS nativo. El estatus de RAS en ADN de CTC se estudió en 15 pacientes, siendo 5 RAS mutado y 10 RAS nativo. El estatus de RAS en tumor primario y en plasma fue coincidente en 21/23 pacientes (91%), siendo 10 RAS mutado en tumor y plasma. De los 6 pacientes en donde se pudo disponer de información sobre los “loci” concretos de la mutación en RAS en el tumor primario (analizados mediante multiplex PCR o RT-PCR (TheraScreen)), hubo coincidencia con el exón y codón de la mutación detectada por BEAMing en el plasma en 3/6 casos (50%). De los 15 pacientes testados mediante BEAMing en ADN de CTC se dispuso de datos sobre el estatus RAS en el tumor primario en 11 casos, demostrando concordancia en 7 casos (5 RAS nativo, 2 RAS mutado). Además, 11 pacientes testados en CTC fueron testados en paralelo mediante BEAMing en plasma. Hubo concordancia en el estatus de RAS en 7 casos (2 RAS mutado, 5 RAS nativo). En uno de los casos RAS mutado en plasma y CTC (F-HUIL-05) la mutación detectada en KRAS se encontró en el mismo “hot spot” (Ex 2 Cd 12). El segundo caso RAS mutado en plasma y CTC (F-HUCSC-09) presentó en plasma una mutación de NRAS (Ex 3 Cd 61) mientras que en CTC se observó una mutación en KRAS (Ex 2 Cd 13) (**Figura 74**). Este caso es importante desde el punto de vista metodológico ya que en él se realizó la purificación mediante CellCelector™ de la muestra de las CTC que habían sido recuperadas por IsoFlux™. En el resto de casos no se realizó purificación mediante CellCelector™ de las CTC recuperadas por IsoFlux™. En los otros 3 pacientes en que se detectaron mutaciones en CTC, estas fueron detectadas en KRAS (2) y en NRAS (1), disponiéndose del estatus del primario y del plasma solo en este último caso (RAS nativos). El segundo caso en el que se detectó una mutación en CTC (NRAS) resultó RAS nativo tanto en el tumor primario como en plasma (F-HUIL-01). Para más información véanse **Tablas 39 y 40**.

Tabla 39. Recuento de CTC y estatus de RAS en tumor primario, plasma y CTC.

Paciente	Código Paciente	Nº CTC	RAS Tumor primario*	RAS Plasma (BEAMing)	RAS CTC (BEAMing)**
1	F-HUCSC-01	15	NATa	NAT	NAT
2	F-HUCSC-02	12	NATa	NAT	NAT
3	F-HUCSC-03	9	NATa	NAT	ND
4	F-HUCSC-04	3	NATa	NAT	ND
5	F-HUCSC-05	1	NATa	NAT	ND
6	F-HUCSC-06	1	NATa	NAT	ND
7	F-HUCSC-07	1	MUTa (KRAS G13D)	NAT	ND
8	F-HUCSC-08	0	MUTa (KRAS G13D)	MUT KRAS Ex 2 Cd 13 (FAM 0.349%)	ND
9	F-HUCSC-09	15	MUTa	MUT NRAS Ex 3 Cd 61 (FAM 0.025%)	MUT KRAS Ex 2 Cd 13 (FAM 11.4%)
10	F-HUCSC-10	2	MUTa (KRAS G12D)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 2.11%)	ND
11	F-HUCSC-11	1	MUTa (KRAS G13D)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 21.275%)	ND
12	F-HUCSC-12	0	MUTa (KRAS G12C)	ND	ND
13	F-HUCSC-13	1	NATa	ND	ND
14	F-HUCSC-14	4	MUTa (KRAS A146P/T/V)	MUT NRAS Ex 4 Cd 146 (FAM 15.46%)	NAT
15	F-HUCSC-15	0	MUTa (KRAS G12V)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 7.36%)	ND
16	F-HUICP-01	4	NATb	NAT	NAT
17	F-HUICP-02	1	ND	ND	MUT KRAS Ex 4 Cd 146 (FAM 0.013%)
18	F-HUICP-03	3	ND	ND	NAT
19	F-HUICP-04	12	ND	ND	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 0.008%)
20	F-HUPH-01	9	MUTc (KRAS)	ND	NAT
21	F-HUPH-02	0	NATc	NAT	ND
22	F-HUPH-03	3	MUTc (KRAS)	NAT	ND
23	F-HUPH-04	4	MUTc (KRAS)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 0.964%)	NAT
24	F-HUPH-05	1	MUTc (KRAS)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 1.527%)	NAT
25	F-HUIL-01	1	NATb	NAT	MUT NRAS Ex 3 Cd 59 (FAM 0.010%)
26	F-HUIL-02	5	NATb	NAT	NAT
27	F-HUIL-03	1	NATb	NAT	NAT
28	F-HUIL-04	10	MUTb	MUT KRAS Ex 2 Cd 13 (FAM 5.745%)	ND
29	F-HUIL-05	1	MUTb	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 24.26%)	MUT KRAS Ex 2 Cd 12 (FAM 0.024%)

Se resaltan en **negrita** los casos mutados indicando los “loci” concretos o “hot spots” de la mutación en los casos en los que este dato se pudo obtener. En **verde** se resaltan los casos testados en el tumor primario mediante tecnología estándar. En **naranja** se resaltan los casos testados por BEAMing en plasma. En **azul** se resaltan los casos testados por BEAMing en ADN de CTC previamente recuperadas con IsoFlux. CTC: células tumorales circulantes, FAM: fracción alélica mutada, HUCSC: Hospital Universitario Clínico San Carlos, HUICP: Hospital Universitario Infanta Cristina de Parla, HUPH: Hospital Universitario Puerta de Hierro, HUIL: Hospital Universitario Infanta Leonor, MUT: mutado, NAT: nativo. *Analizado mediante PCR múltiple con sistema Idylla (a), o RT-PCR (Cobas4800 (b) o TheraScreen (c)). **Las CTC fueron recuperadas con IsoFlux y su ADN analizado mediante tecnología BEAMing.

Tabla 40. Concordancia del estatus de RAS y del tipo de mutación entre el tumor primario, el plasma y las CTC en los pacientes del grupo 3.

CONCORDANCIA ESTATUS (NATIVO + MUTADO)			
	KRAS & NRAS (TUMOR* VS CTC** VS PLASMA)		
	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{PLASMA}	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{CTC}	BEAMing ^{PLASMA} vs BEAMing ^{CTC}
Grupo 3	91% (21/23)	58% (7/12)	64% (7/11)

CONCORDANCIA ESTATUS (SÓLO ESTATUS MUTADO)			
	KRAS & NRAS (TUMOR VS CTC VS PLASMA)		
	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{PLASMA}	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{CTC}	BEAMing ^{PLASMA} vs BEAMing ^{CTC}
Grupo 3	83% (10/12)	33% (2/6)	40% (2/5)

CONCORDANCIA POR TIPO DE MUTACIÓN					
	KRAS & NRAS (TUMOR VS CTC VS PLASMA)				
	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{PLASMA}	RTPCR ^{TUMOR} vs BEAMing ^{CTC}	BEAMing ^{PLASMA} vs BEAMing ^{CTC}		
Grupo 3	50%	NA	20% (1/5)	KRAS Ex 2 Cd 12 (2)	
	(3/6)				
				KRAS Ex 2 Cd 13 (1)	

* Se emplearon mPCR (Idylla) o RT-PCR (Cobas o TheraScreen®) para estudiar el estatus de RAS en el tumor primario. Sólo se empleó uno de los 3 métodos para cada paciente.

* **El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema IsoFlux™
Se resaltan en rojo la mutación detectada en KRAS o NRAS mediante BEAMing

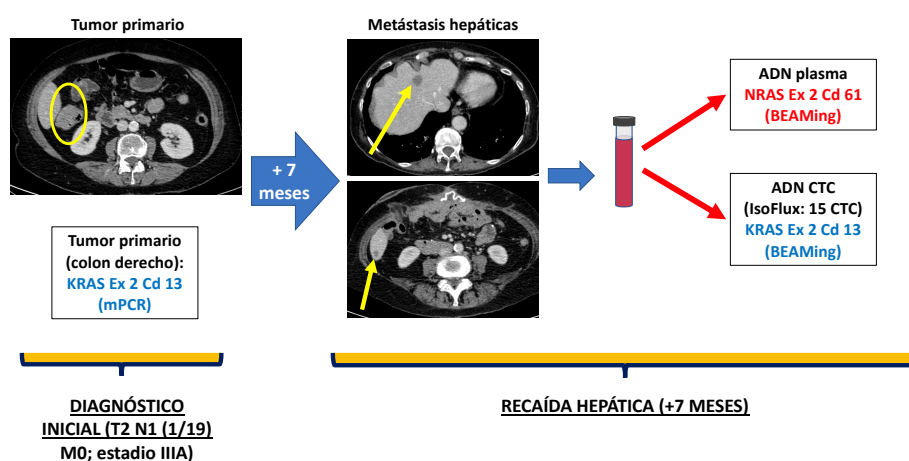


Figura 74. Perfil mutacional de KRAS por PCRm en tumor primario y mediante BEAMing en ADN libre circulante y ADN de CTC recuperadas por IsoFlux y purificadas con CellCelector. La metodología estándar (PCRm, Idylla) detectó una mutación en el exón 2 codón 13 de KRAS. La misma mutación se detectó mediante tecnología BEAMing en ADN de CTC previamente recuperadas con IsoFlux y purificadas con CellCelector (ALS GmbH, Alemania). Al enumerar las CTC con IsoFlux se detectaron 15 CTC. Sin embargo al analizar el ADN libre circulante en el plasma mediante BEAMing, se detectó una mutación diferente, en este caso en NRAS Ex 2 Cd 61. CTC: células tumorales circulantes, Ex: exón, Cd: codón, PCRm: PCR multiplex (Idylla, Biocartis NV, Bélgica).

5.3. Parte 3: Evaluación de la capacidad de detección y recuento de CTC con el sistema IsoFlux y viabilidad de su caracterización molecular en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente o metastásica (R/M).

5.3.1. Características basales de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

Entre febrero de 2016 y octubre de 2018 se incluyó a 14 pacientes en fase recurrente y/o metastásica, 9 con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC), y 5 con carcinomas de tipo no epidermoide, de los cuales hubo 1 con adenocarcinoma (ADCA) de tipo intestinal de origen nasosinusal, 1 con carcinoma ex-adenoma pleomorfo de parótida, 2 con ADCA de ducto salivar de parótida y 1 con carcinoma neuroendocrino de alto grado de parótida (**Figura 75**).

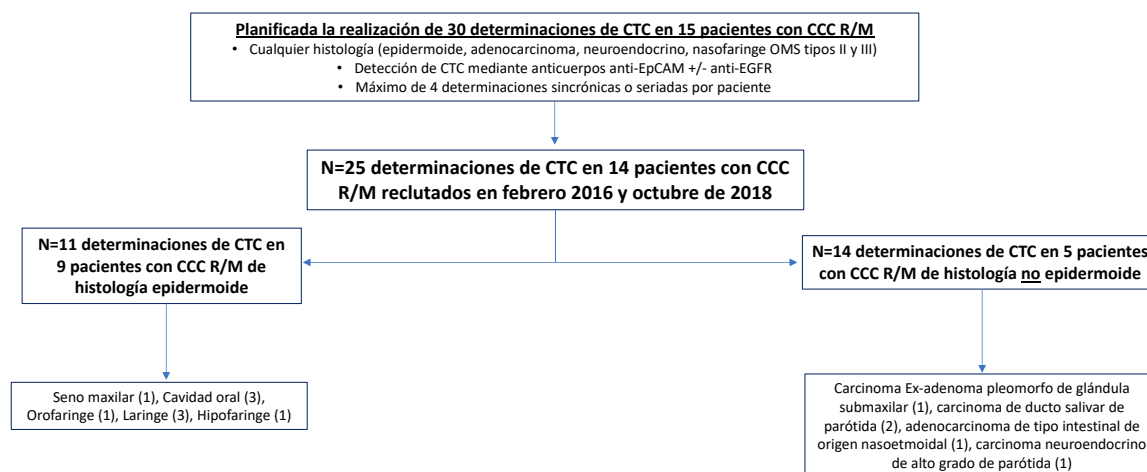


Figura 75. Diagrama de flujo con los pacientes y determinaciones de CTC planificados para su inclusión en el grupo 4, y los incluidos hasta la fecha. CCC R/M: cáncer de cabeza y cuello en fase recurrente o metastásica; CTC: células tumorales circulantes.

La distribución por sexos fue de 13 varones y 1 mujer. La mediana de edad en el momento de la extracción de CTC fue de 60 años (rango min-max: 36-81). La mayoría había debutado en fase localmente avanzada (LA) (78.6%) y posteriormente había recaído locoregionalmente y/o a distancia (fase R/M). Sólo 3 pacientes habían debutado en fase metastásica. En el momento de la extracción de las CTC los 14 pacientes se encontraban en fase R/M, 8 con enfermedad recurrente local y a distancia, 4 sólo con enfermedad a distancia y 1 paciente con enfermedad recurrente local exclusivamente. La mayor parte había recibido radioterapia locorregional previa (76.9%) y quimioterapia (64.3%) para la enfermedad localmente avanzada. Los 9 pacientes con histología epidermoide estaban más pretratados, habiendo sido sometidos a cirugía, RT y QT para la enfermedad LA y al menos 1 línea de quimioterapia para la enfermedad R/M, el

55.5%, 88.9%, 77.8% y 88.9%, respectivamente, frente al 80%, 80%, 40% y 40% de los 5 pacientes con carcinomas de histología no epidermoide. De los 9 pacientes con histología epidermoide, el 66.7% eran platino-refractarios y el 55.5% había recibido cetuximab previo en el momento de la extracción de CTC. Las características de los pacientes se resumen en **Tabla 41**.

Tabla 41. Resumen de las características de los pacientes en la población global.

VARIABLE			n=14			
Sexo (varón:mujer)			13:1			
Edad en extracción de CTC (mediana)			60 (36-81)			
Estadio al diagnóstico según AJCC 8ª Edición (2017)			I-III: 0	IVA: 9/14	IVB: 2/14	IVC: 3/14
Fase R/M		Recurrente local	1/14			
		Recurrente local y a distancia	9/14			
		Recurrente a distancia	1/14			
		Debut metastásico	3/14			
Radioterapia previa a CTC		10/14				
Tratamiento con platino previo a CTC		Enfermedad platino-refractaria	8/13			
		Enfermedad platino-sensible	4/13			
Tratamiento con cetuximab previo a CTC			5/14			
Nº líneas de QT previas a CTC		0 líneas	1/14			
		1 línea	8/14			
		≥ 2 líneas	5/14			
VARIABLE			Epidermoide N=9		No epidermoide N=5	
Localización del tumor primario			Cavidad oral (3), Orofaringe (1), Laringe (3), Hipofaringe (1), Seno maxilar (1)		Parótida (4), Nasoetmoidal (1)	
		Enfermedad Metastásica		2/9		1/5
		Enfermedad LA		7/9		4/5
		Manejo Enfermedad LA	Cirugía	5/7		4/5
			Radioterapia	7/7		4/5
			Quimioterapia	7/7		2/5
Enfermedad platino-refractaria previo a CTC			6/9		1/5	
Tratamiento con cetuximab previo a CTC			5/9		-	
Nº líneas de QT previas a CTC		0 líneas		1/9		3/5
		≥ 1 línea		4/9		2/5
		≥ 2 líneas		4/9		-

(-): no aplicable, **AJCC**: American Joint Committee on Cancer, **QT**: quimioterapia, **CTC**: células tumorales circulantes, **EGFR**: epithelial growth factor receptor, **EpCAM**: epithelial cell adhesion molecule, **LA**: localmente avanzada.

5.3.2. Detección y enumeración de CTC con IsoFlux en pacientes con CCC R/M de histologías de tipo epidermoide y no epidermoide.

Se realizaron 25 determinaciones de CTC en 14 pacientes, 9 de ellas en pacientes con carcinomas de histología epidermoide y 5 de ellas en casos con histología no epidermoide. En 5 pacientes se realizaron determinaciones seriadas de CTC (2 epidermoides y 3 no epidermoides). La mediana de CTC detectadas en las 25 determinaciones fue 4 (rango min-max: 0-49). En las 11 determinaciones en tumores epidermoides la mediana de CTC fue 4 (rango min-max: 0-49) y en las 14 determinaciones en tumores no epidermoides la mediana de CTC fue 3 (rango min-max: 0-26). Se emplearon anticuerpos anti-EpCAM solos para la detección y recuperación de CTC en 17 determinaciones, 6 en carcinomas epidermoides y 11 en no epidermoides. Se emplearon a la vez anticuerpos anti-EpCAM y anti-EGFR para la detección y recuperación de CTC en 5 determinaciones en carcinomas de histología epidermoide y en 3 determinaciones en carcinomas no epidermoides. La mediana de CTC en las determinaciones realizadas exclusivamente con anticuerpos anti-EpCAM fue 4 (rango min-max: 0-49) y también 4 CTC (rango min-max 0-29) en las realizadas con anticuerpos anti-EpCAM y anti-EGFR a la vez (**Tabla 42**).

Tabla 42. Número de determinaciones y recuento de CTC en la población global y en función del tipo histológico y del anticuerpo empleado en la detección.

VARIABLE		N=14 pacientes	
Nº de determinaciones de CTC		N=25	
Mediana de CTC detectadas (rango: Min-Max)		4 (0-49)	
Mediana de CTC detectadas en función de anticuerpos empleados (rango: Min-Max)	Anti-EpCAM (N=17 determinaciones)	4 (0-49)	
	Anti-EpCAM + Anti-EGFR (N=8 determinaciones)	4 (0-29)	
Tipo histológico (Nº de pacientes)		Epidermoide (N=9)	No epidermoide (N=5)
Nº determinaciones de CTC		N=11	N=14
Mediana de CTC detectadas (rango: Min-Max)		4 (0-49)	3 (0-26)
Nº determinaciones de CTC según el anticuerpo de detección empleado	Anti-EpCAM	6/11	11/14
	Anti-EpCAM + Anti-EGFR	5/11	3/14
Mediana de CT de CTC según el anticuerpo de detección empleado	Anti-EpCAM	4 (0-49)	3 (0-26)
	Anti-EpCAM + Anti-EGFR	4 (0-29)	1 (2-6)

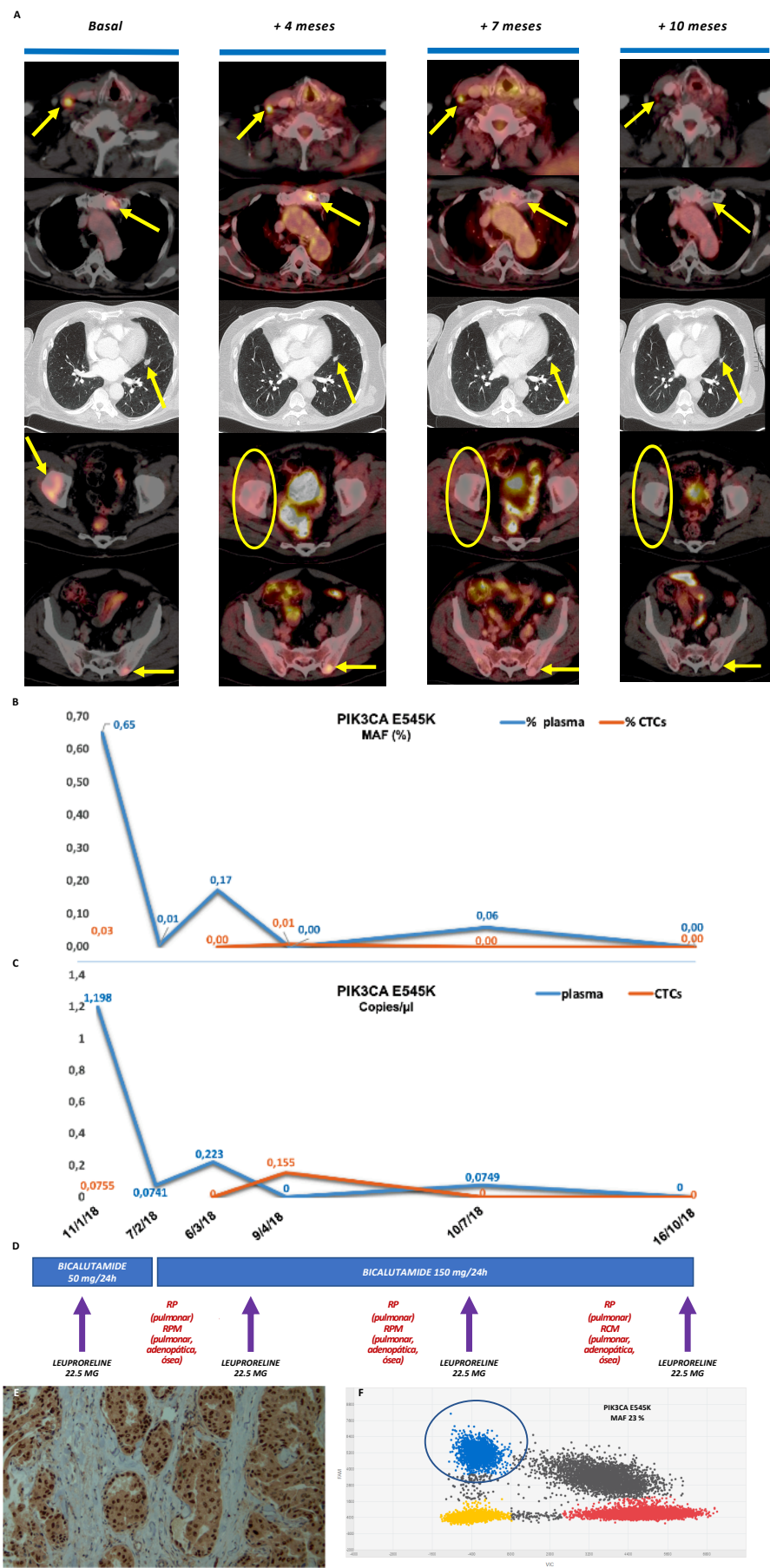
CTC: células tumorales circulantes, EGFR: epithelial growth factor receptor, EpCAM: epithelial cell adhesion molecule.

5.3.3. Caracterización molecular de CTC recuperadas con IsoFlux mediante PCR digital y castPCR en pacientes con cáncer de cabeza y cuello de histología no epidermoide.

De los 5 pacientes con carcinomas no epidermoides se realizaron estudios moleculares en 3 (**Tabla 43**). En 2 de ellos, con adenocarcinomas de ducto salivar (CDS) de parótida metastásicos, se analizaron las mutaciones E545K, E542K y H1047R. Este tipo de cáncer se caracteriza por la sobreexpresión del receptor androgénico (RA) en cerca del 100% de los casos, y presenta similitudes histomorfológicas con dos entidades caracterizadas por la sobreexpresión del RA como son el carcinoma de mama de tipo apocrino y el cáncer de próstata.

En 1 de los casos la mutación E545K tanto en el tumor primario como en ADN tumoral circulante en plasma y en ADN de CTC, observando la disminución de ambos componentes 1 mes después de comenzar el bloqueo androgénico combinado (BAC) con un agonista de la LHRH (leuprorelina) y el antiandrógeno bicalutamida. Esta respuesta en plasma y CTC, anticipó la respuesta radiológica observada a los 3 meses de iniciar el tratamiento (**Figura 76**).

***Figura 76 (Ver página siguiente).** Respuesta parcial duradera al bloqueo androgénico combinado en un carcinoma de ducto salivar (CDS) con rápida disminución de los valores de ADN mutado en PIK3CA E545K tanto en ADN libre circulante como en ADN de CTC. ¹⁸F-FDG-PET/CT basal que objetivó (no se muestran todas las lesiones) metástasis ganglionares en región supraclavicular derecha, subcarinal e hilar bilateral (la mayor de 12 mm), metástasis pulmonares bilaterales (la mayor, de 15 mm, en la lingula) y metástasis óseas líticas en el extremo proximal de la clavícula izquierda, extremo craneal del esternón, escápula derecha, hueso ilíaco izquierdo y acetábulo derecho, todas con captación patológica de FDG (flechas amarillas). Después de 10 semanas de BAC, se observó una respuesta parcial radiológica y metabólica en el ganglio supraclavicular derecho y los nódulos pulmonares y una respuesta metabólica mayor en la mayoría de las metástasis óseas (flechas) con la desvitalización completa de la lesión acetabular derecha (círculo amarillo). logrando una respuesta radiológica y metabólica casi completas a los 6 meses (flechas amarillas y círculo) (A, D). Las flechas verticales de color púrpura indican la administración de leuprorelina cada 3 meses. Las barras azules indican el tratamiento oral diario con bicalutamida en las dosis especificadas (D). Antes de comenzar el BAC, se extrajo sangre para la monitorización de la mutación PIK3CA E545K en ADN libre circulante (ADNlc) (líneas azules) y ADN de CTC (líneas naranjas). Solo 4 semanas después de comenzar el tratamiento, se observó una disminución brusca del valor de FAM y copias/ μ L de la mutación PIK3CA tanto en el ADNlc como en CTC, lo que anticipó la respuesta parcial observada en las imágenes más de 6 semanas después y la respuesta casi completa observada en octubre 2018. En las cinco determinaciones de CTC realizadas se detectaron un total de 7, 1, 6, 1 y 8 CTC, respectivamente (AD). La inmunohistoquímica muestra una sobreexpresión casi universal del receptor de andrógenos (20x) (E). Diagrama que muestra la FAM de la mutación PIK3CA E545K mediante PCR digital en la muestra de tumor sólido obtenida de la recaída locorregional de 2015. Los puntos azules rodeados representan alelos mutados (F).ADNlc: ADN libre circulante, BAC: bloqueo androgénico combinado, CTC: célula tumoral circulante, FAM: frecuencia alélica mutada, RMC: respuesta metabólica completa, RMP: respuesta metabólica parcial, RP: respuesta parcial.*



En el segundo caso de CDS se detectó la mutación H1047R en el tumor primario, sin poder detectarla en CTC aunque sí en plasma antes, durante y al final del tratamiento con BAC. La no mejoría en los títulos de la fracción mutada en plasma a lo largo del tratamiento anticipó la ausencia de respuesta al tratamiento observada en este paciente (Figura 77).

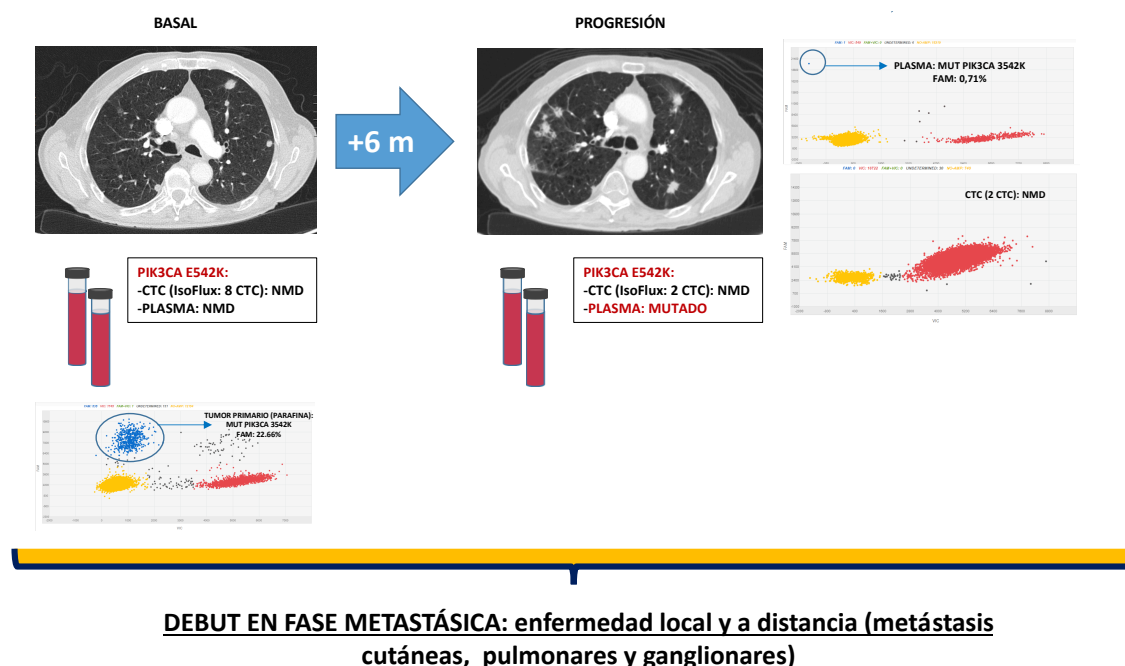


Figura 77. Progresión al bloqueo androgénico combinado en un Carcinoma de Ducto Salivar con mutación en PIK3CA E542K. ^{18}F -FDG-PET/CT basal que objetivó (no se muestran todas las lesiones) metástasis ganglionares pulmonares y cutáneas todas con captación patológica de FDG (no mostradas imágenes de fusión, sólo TC). Después de 6 meses de tratamiento con BAC con leuporelina trimestral y bicalutamida diaria (100 mg – 0 – 50 mg), se observó progresión pulmonar. Mediante PCR digital, se detectó la mutación E542K de PIK3CA en el tumor primario (FAM 22.66%). Antes de comenzar el BAC, se extrajo sangre para la monitorización de la mutación por PCR digital en plasma y en CTC recuperadas con IsoFlux (se contaron 8 CTC). No se detectó la mutación ni en plasma ni en CTC. A los 6 meses del inicio del tratamiento se detectó en plasma la mutación del tumor primario (FAM 0.71%) pero no en CTC (se contaron 2 CTC con IsoFlux). BAC: bloqueo androgénico combinado, CTC: célula tumoral circulante, FAM: frecuencia alélica mutada.

Por último, se estudió a un paciente afecto de un adenocarcinoma de tipo intestinal (ADTI) de origen nasoetmoidal que había recaído con una gran masa que se extendía intracranealmente y hacia el paladar duro. El paciente había sido biopsiado al diagnóstico en el año 2013, en la 1ª recaída en el año 2014 y en la última recaída a finales del año 2015. Dadas las similitudes con el adenocarcinoma de colon de esta rara entidad, que es propia de trabajadores expuestos durante años al contacto con polvos inorgánicos (madera, cuero, etc), se realizó el estudio mutacional de RAS y BRAF en las

dos primeras biopsias mediante PCR multiplex (Idylla, Biocartis, Bélgica), resultando en ambos casos RAS y BRAF NATIVO. Ante estos hallazgos, se decidió iniciar tratamiento por uso compasivo con el agente anti-EGFR Cetuximab (400 mg/m² (carga), 250 mg/m² (siguientes)) y CPT-11 (Irinotecan) a dosis reducida de 150 mg/m²/15d, dada la edad del paciente), un esquema empleado habitualmente en el tratamiento del adenocarcinoma colorectal RAS nativo. A los 6 días del inicio del tratamiento se extrajo sangre para el estudio de CTC por IsoFlux, detectándose 26 CTC. El estudio mediante castPCR del ADN de las CTC demostró una mutación clara en KRAS Exon 2 Codón 12 (G12A) (dCT 12). Ante este hallazgo se procedió a estudiar nuevamente mediante BEAMing, una tecnología más sensible que la PCR multiplex, las muestras de las 2 biopsias obtenidas en 2013 y 2014 y la citología obtenida en 2015. El estudio mediante BEAMing confirmó la presencia de una mutación en KRAS en el mismo “hot spot” que la detectada en las CTC. Además se detectó una segunda mutación, esta en NRAS. La fracción alélica mutada de ambas mutaciones aumentó de manera evidente en el orden cronológico de las biopsias (**Figuras 78-80**). Para más información véase en la sección de ANEXOS el original del artículo de este caso publicado en la revista *The Oncologist* (414).

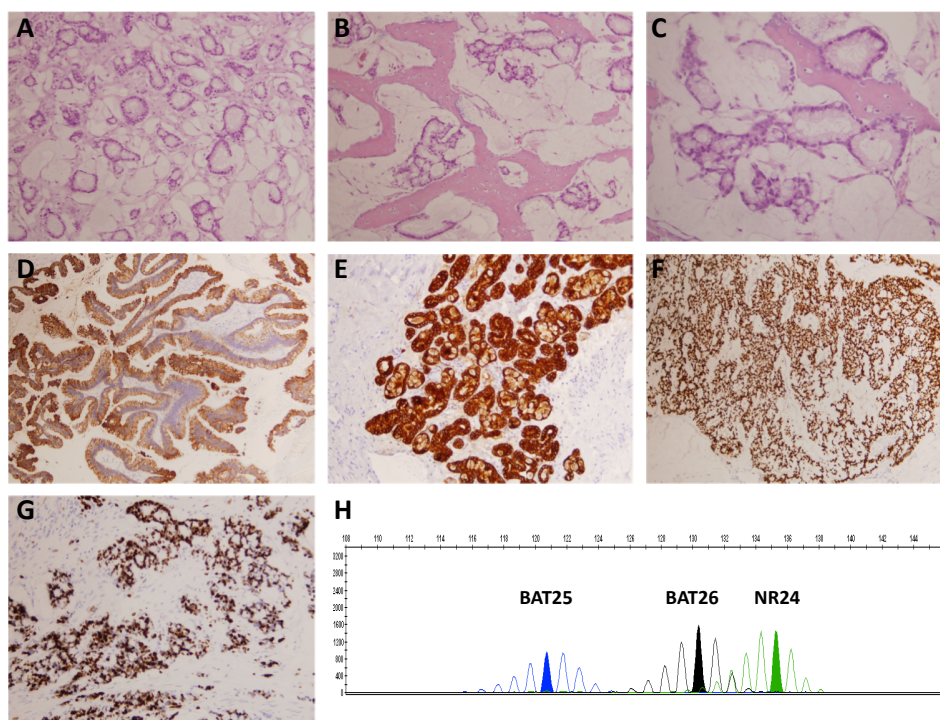


Figura 78 (tomada del original de Cabezas-Camarero y cols., con permiso de Alphamedpress). Anatomía patológica del ADTI. La H&E muestra la formación de glándulas productoras de moco que recuerdan al adenocarcinoma de colon de tipo mucinoso (A-C). Se muestran también el estudio de inestabilidad de microsatélites que resultó estable (H).

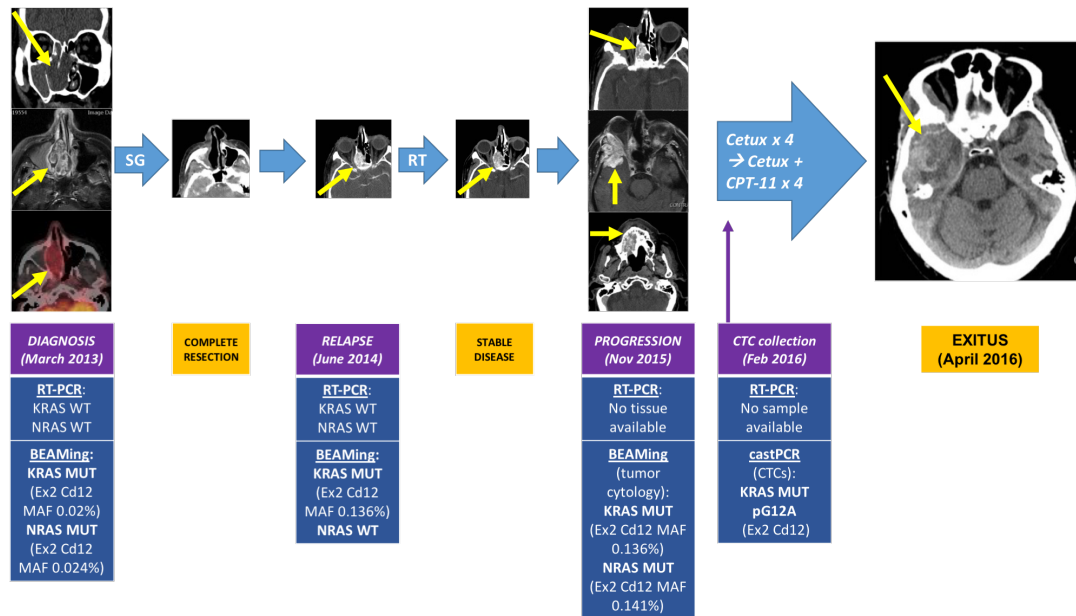


Figura 79 (tomada del original de Cabezas-Camarero y cols., con permiso de Alphamedpress). Resumen de la historia oncológica del paciente con ADTI de origen nasoetomoidal y estudio molecular realizado en las muestras del tumor primario y en ADN de CTC. Cetux: cetuximab, CPT-11: irinotecan, Cd: codón, CTC: células tumorales circulantes, Ex: exón, MAF: fracción alélica mutada, MUT: mutado, RT-PCR: PCR en tiempo real (TheraScreen), WT: nativo.

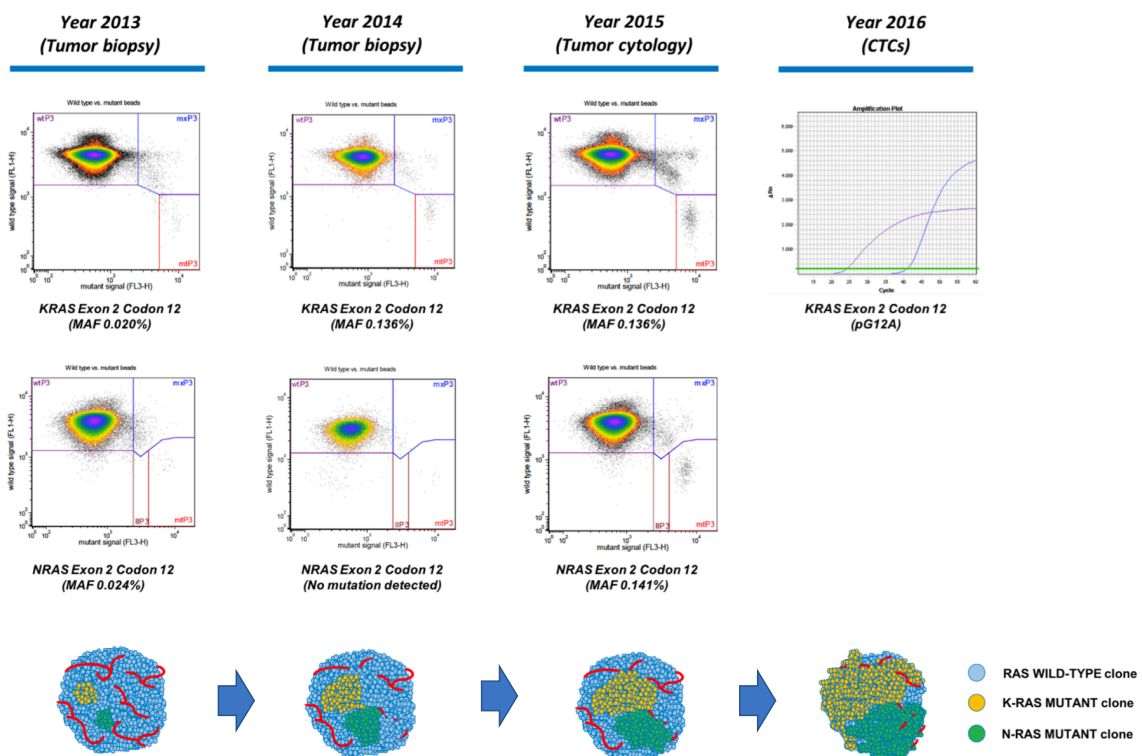


Figura 80 (tomada del original de Cabezas-Camarero y cols., con permiso de Alphamedpress). Resumen de la historia oncológica del paciente con ADTI de origen nasoetomoidal y estudio mutacional de RAS mediante BEAMing en las muestras del tumor primario y mutación encontrada por castPCR en ADN de CTC. La mutación en CTC se encuentra en el mismo "hot spot" que la detectada por BEAMing en el tumor primario. En el tumor primario también se detectó una mutación en NRAS. Tanto la mutación en KRAS como en NRAS aumentó a lo largo de la evolución de la enfermedad. ADTI: adenocarcinoma de tipo intestinal, Cetux: cetuximab, CPT-11: irinotecan, Cd: codón, CTC: células tumorales circulantes, Ex: exón, MAF: fracción alélica mutada, MUT: mutado, RT-PCR: PCR en tiempo real (TheraScreen), WT: nativo.

Tabla 43. Recuento de CTC y estudios moleculares realizados en CTC y en plasma en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello de histología no epidermoide.

PACIENTE	Tipo histológico	Sublocalización	R/M	Mutación detectada en tumor sólido	Anticuerpo en cada determinación	Nº CTC	Tecnología molecular en CTC / Plasma	Mutación en CTC	Mutación en plasma (ADNtc)
CC-HCSC1	ADCA tipo intestinal	Naso-etmoidal	R	KRAS Exon 2 Codon 12 (BEAMing)	EpCAM	26	castPCR	KRAS pG12A* (castPCR)	-
CC-HCSC2	CExAP	Glándula submaxilar	M	-	EpCAM	0	-	-	-
						0	-	-	-
CC-HCSC3	ADCA ducto salivar	Glándula parótida	M	PIK3CA E542K (FAM 22.6%)	EpCAM	8	dPCR	MND	MND
					EpCAM + EGFR	2	dPCR	MND	FAM: 2.12%
					EpCAM	2	dPCR	MND	FAM: 0.18%
					EpCAM	3	dPCR	MND	MND
CC-HCSC4	ADCA ducto salivar	Glándula parótida	M	PIK3CA E545K (FAM 22.9%)	EpCAM	7	dPCR	PIK3CA E545K FAM: 0.03%	PIK3CA E545K FAM: 0.65%
					EpCAM	0	dPCR	-	PIK3CA E545K FAM: 0.01%
					EpCAM + EGFR	1	dPCR	MND	PIK3CA E545K FAM: 0.17%
					EpCAM + EGFR	6	dPCR	PIK3CA E545K FAM: 0.01%	MND
					EpCAM	1	dPCR	MND	PIK3CA E545K FAM: 0.06%
					EpCAM	8	dPCR	MND	MND
CC-HCSC5	Carcinoma neuroendocrino de alto grado	Glándula parótida	M	-	EpCAM	4	-	-	-

*Se resaltan con el mismo color los resultados aplicables a un mismo caso.

ADCA: adenocarcinoma; CExAP: Carcinoma ex - adenoma pleomorfo; dPCR: PCR digital; EGFR: epidermal growth factor receptor; EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule; FAM: fracción alélica mutada; M: enfermedad metastásica; MND: mutación no detectada; R: enfermedad recurrente local; (-): estudio no realizado.

5.3.4. Caracterización molecular de CTC recuperadas con IsoFlux mediante secuenciación masiva (Next Generation Sequencing) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello de histología epidermoide.

En 7 de los 9 pacientes con carcinomas de tipo epidermoide se secuenciaron mediante NGS de ADN de CTC y ADN libre circulante en plasma, 15 genes habitualmente alterados en esta entidad.

Se detectaron 4281 variantes. Tras aplicar varios filtros (miSeq PASS filter, > 500 lecturas, FAM > 5%) se identificaron 360 variantes, 200 de las cuales correspondieron a variantes diferentes. La mayor parte de estas 200 variantes fueron variantes “intrónicas” y en segundo lugar variantes no sinónimas. En la **Tabla 44** se resumen las variantes probablemente patogénicas detectadas en CTC y en plasma. La concordancia entre las

variantes encontradas en CTC y en plasma fue muy baja, encontrándose únicamente una variante probablemente patogénica coincidente en CTC y plasma en 6 de los 7 pacientes estudiados (**Figuras 81 y 82**).

Tabla 44. Recuento de CTC con IsoFlux™ en 9 pacientes con cáncer de cabeza y cuello y resultados de los estudios moleculares empleando secuenciación masiva (NGS).

PACIENTE	Tipo histológico	Sublocalización	R/M	Momento extracción de CTC	Anticuerpo	Nº CTC	Análisis mutacional	Mutaciones* detectadas en CTC (n)	Mutaciones* detectadas en plasma (n)
CC-HCSC6	CECC	Seno maxilar	M	Progresión a 4ª línea	EpCAM + EGFR	4	NGS	NOTCH2 (2)	NOTCH3 (1), CASP8 (1), IRF6 (1), NOTCH2 (1), DICER1 (1,1), SYNE2 (4,1,3), SYNE1 (7,9,6), PIK3CA (1), TP53 (1)
								NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)	
CC-HCSC7	CECC	Cavidad oral	M	Progresión a 1ª línea (Basal)	EpCAM	4	NGS	NOTCH2 (2)	NOTCH2 (1)
				Progresión a 3ª línea (+12 m)	EpCAM + EGFR	0	NGS	-	-
CC-HCSC8	CECC	Laringe	M	Progresión a 1ª línea	EpCAM	49	NGS	CASP8 (1), SYNE2 (1, 1), NOTCH1 (1), NOTCH2 (1), DICER1 (1), SYNE2 (1)	-
								NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)	
CC-HCSC9	CECC	Cavidad oral	M	Progresión a 3ª línea	EpCAM	8	NGS	NOTCH2 (1), SYNE1 (2)	PTEN (1), RB1 (2), TP53 (1), PIK3CA (1), RIPK4 (1), NOTCH2 (1), SYNE2 (3,3), SYNE1 (4,2,3), NOTCH1 (1,1), TP63 (1)
								NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)	
CC-HCSC10	CECC	Laringe	M	Pre-1ª línea (Basal)	EpCAM	0	NGS	-	-
				Progresión a 3ª línea (+12 m)	EpCAM + EGFR	1	NGS	-	-
CC-HCSC11	CECC	Oro-faringe	R	Pre-1ª línea	EpCAM	2	NGS	NOTCH2 (1)	NOTCH3 (2,1,1), PIK3CA (1), NOTCH2 (1), SYNE2 (5,2,3), SYNE1 (3), NOTCH1 (1)
								NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)	
CC-HCSC12	CECC	Laringe	M	Progresión a 1ª línea	EpCAM	4	NGS	NOTCH2 (1)	NOTCH2 (1), SYNE2 (2,2), SYNE1 (3), NOTCH3 (1), PIK3CA (1)
								NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)	
CC-HCSC13	CECC	Laringe	M	Progresión a 2ª línea	EpCAM + EGFR	7	NGS	NMD	IRF6 (1), NOTCH1 (1), NOTCH2 (1), DICER1 (1), SYNE2 (2,1,2), SYNE1 (1,1), PIK3CA (1), NOTCH3 (1)
CC-HCSC14	CECC	Cavidad oral	R	Pre-1ª línea	EpCAM + EGFR	29	NGS	PIK3CA (1), SYNE1 (1,3), SYNE2 (1,2,1), NOTCH1 (1), RIPK4 (1), NOTCH3 (2)	-

ADCA: adenocarcinoma, BEAMing: Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics, EGFR: epidermal growth factor receptor; EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule, n: número de mutaciones detectadas en cada gen, NMD: no mutación detectada, NGS: secuenciación masiva, R/M: recurrente o metastásico, (-): estudio no realizado. *Se presentan únicamente aquellas variantes con una fracción alélica mutada (FAM) >5% y que tras la aplicar varios predictores in silico están registradas como al menos posiblemente patogénicas. Se resaltan en **rojo** el número de variantes que afectan al “splicing”, en **azul** las variantes de tipo “stop gained” y en **verde** las variantes de tipo “frameshift”. En color **morado** se indican las variantes detectadas tanto en CTC como en plasma.

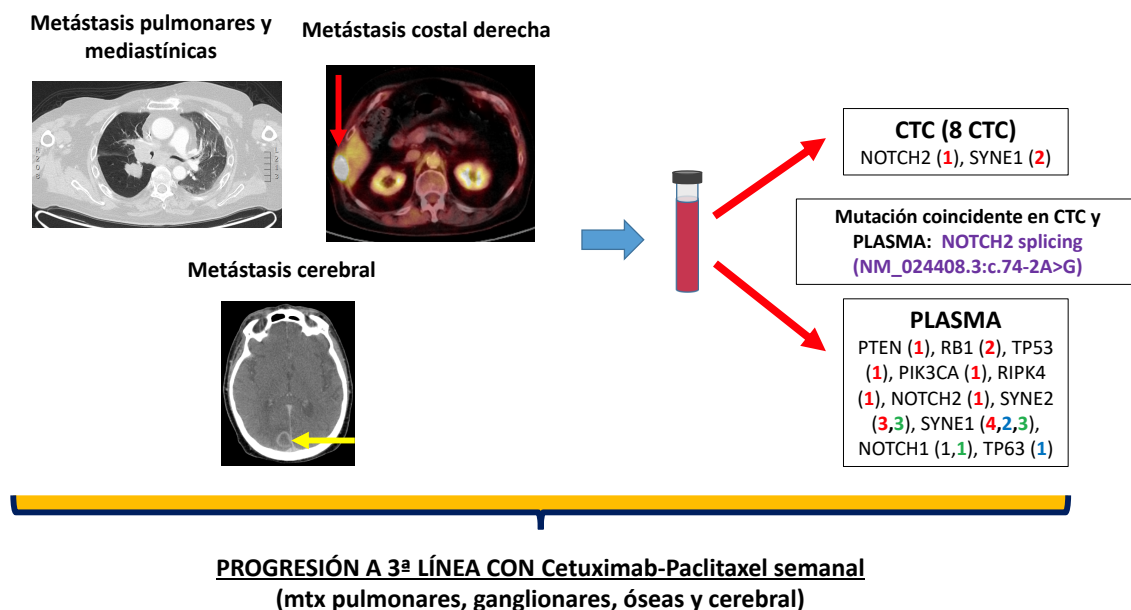


Figura 81. Detección y recuperación de CTC con IsoFlux y estudio molecular en ADN de CTC y ADN libre circulante en plasma mediante panel de secuenciación masiva. Paciente (CC-HCSC9) en progresión a una 3ª línea de quimioterapia con Cetuximab y Paclitaxel semanales. Se extrajeron 30 ml de sangre periférica para el recuento de CTC y la realización de estudios moleculares en CTC y en plasma. Se detectaron 3 mutaciones en CTC y 25 mutaciones en ADN libre circulante en plasma, todas ellas posiblemente patogénicas. Hubo una mutación concordante en CTC y en plasma en el gen NOTCH2. CTC: células tumorales circulantes, mtx: metástasis. Se resaltan en rojo el número de variantes que afectan al “splicing”, en azul las variantes de tipo “stop gained” y en verde las variantes de tipo “frameshift”. En color morado se indica la variante detectada tanto en CTC como en plasma.

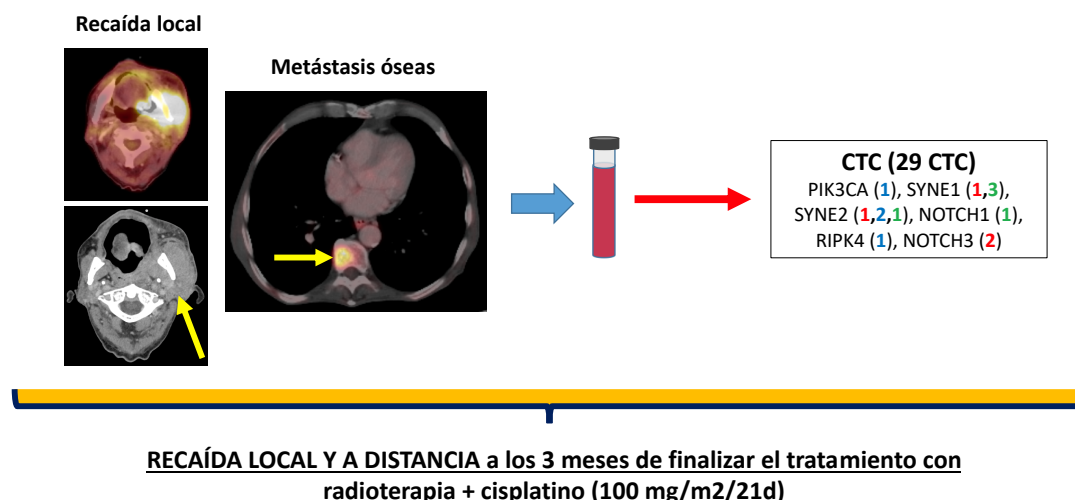


Figura 82. Detección y recuperación de CTC con IsoFlux y estudio molecular en ADN de CTC mediante panel de secuenciación masiva. Paciente (CC-HCSC14) con recaída local y a distancia 3 meses después de haber finalizado el tratamiento con cisplatino y RT con intención radical. Se extrajeron 20 ml de sangre periférica detectándose 29 CTC. El estudio de secuenciación masiva en ADN de CTC demostró 12 variantes posiblemente patogénicas en PIK3CA, SYNE1, SYNE2, NOTCH1, RIPK4 y NOTCH3. No hubo muestra suficiente para llevar a cabo el estudio en plasma. CTC: células tumorales circulantes, mtx: metástasis. Se resaltan en rojo el número de variantes que afectan al “splicing”, en azul las variantes de tipo “stop gained” y en verde las variantes de tipo “frameshift”.

6. DISCUSIÓN

“The Romans were as divided about how they thought the world worked, or should work, as we are. There is no simple Roman model to follow. If only things were that easy”

Mary Beard

“Epilogue. The first Roman millennium”

SPQR. A history of ancient Rome

6.1. GENERALIDADES

Las CTC han demostrado tener valor pronóstico en varias entidades, incluidas las dos estudiadas aquí, el CCR y el CCC (210)(314)(344)(350)(351)(354)(413)(374). Sin embargo, también es necesario obtener información molecular de las CTC para convertirlas en una modalidad de biopsia líquida más útil y atractiva para la investigación clínica. La caracterización molecular de las CTC es factible pero compleja, ya que requiere, en primer lugar, de métodos de aislamiento altamente eficientes que permitan obtener una muestra de alta pureza - es decir con baja contaminación leucocitaria- y con un número de CTC cuanto más alto mejor, con el fin de disponer de suficiente cantidad de ADN para el análisis molecular. En segundo lugar, debido a la limitada cantidad de ADN disponible incluso empleando los mejores métodos de enriquecimiento de CTC, se necesitan tecnologías de muy alta sensibilidad para llevar a cabo el mencionado análisis. Varios estudios han demostrado la utilidad tanto de análisis dirigidos a “puntos calientes” (“hot spots”) como de análisis no dirigidos (como la secuenciación masiva, que con menor sensibilidad que los análisis dirigidos, es capaz de secuenciar grandes regiones o incluso el exoma completo de los genes de interés), si bien gran parte de los estudios con CTC en el CCR y en el CCC se han limitado al recuento de las CTC sin llevar a cabo su caracterización molecular (Veánse **Tablas 5, 8, 10 y 11** en la sección de Introducción). Por el contrario, la detección del ADNtc en el plasma se ha empleado principalmente como una fuente de información molecular basada, en su mayoría, en análisis dirigidos a regiones o puntos calientes de los genes de interés (Veánse **Tablas 9, 12-14** en la sección de Introducción). El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de una tecnología de enriquecimiento de CTC (IsoFlux), que, a diferencia de la, hasta ahora, considerada estándar (CellSearch), constituye un “todo en uno” que permite el aislamiento, enumeración y recuperación de CTC. Con el fin de demostrar su utilidad en diferentes contextos, se procedió a su evaluación en pacientes con adenocarcinoma colorrectal, uno de los cánceres más prevalentes en la población, para poder establecer, por primera vez, un punto de corte con capacidad pronóstica y para testar diferentes tecnologías de análisis mutacional de RAS en las CTC. Por otra parte, se empleó también en pacientes con carcinoma epidermoide y no epidermoide de cabeza y cuello, entidad en la que IsoFlux no ha sido previamente empleado, y donde se evaluaron la NGS y la

PCR digital como métodos de análisis mutacional en ADN de CTC de los genes más frecuentemente alterados en el CCC.

Así pues, el presente estudio comprende la evaluación de IsoFlux como tecnología de enriquecimiento acoplada a diversas técnicas de análisis mutacional de alta sensibilidad en 2 de los 5 cánceres más prevalentes en población española y en tres tipos histológicos distintos (adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma neuroendocrino), siendo uno de los pocos trabajos que ha evaluado de manera sistemática el valor pronóstico y utilidad para la caracterización molecular de una misma tecnología de CTC acoplada a diversas técnicas de análisis mutacional.

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se comparó, en el grupo 1, el sistema IsoFlux™ para el recuento de CTC en pacientes con CCRm con el sistema CellSearch®, la tecnología considerada de referencia por el número de estudios realizados, y la única aprobada por la FDA hasta la fecha (6) (Véase **Tabla 5** en Introducción). Se incluyó a 34 pacientes con CCRm (KRAS^{NAT} y KRAS^{MUT}), QT-naïve para la enfermedad avanzada (grupo 1) y a 22 pacientes con CCRm KRAS^{NAT} en progresión y que hubieran recibido previamente tratamiento con anti-EGFR (grupo 2). En los grupos 1 y 2 se estudió la viabilidad de IsoFlux™ para recuperar CTC cuyo ADN fue empleado para realizar análisis mutacionales de KRAS mediante 3 técnicas diferentes. En el grupo 3 se incluyó a 29 pacientes bajo los mismos criterios que los pacientes del grupo 1 (CCRM KRAS^{NAT} y KRAS^{MUT} QT-naïve para la enfermedad avanzada) con el fin de comparar el análisis de RAS en CTC con el del ADNtc empleando en ambos casos la tecnología BEAMing. Las características de los pacientes de los grupos 1, 2 y 3, fueron similares a las descritas en otros estudios en pacientes con CCRm, con algunos matices, como que en el grupo 1 el número de mujeres fue superior al de hombres (59% vs 41%), al contrario que en la mayoría de estudios en CCRm, donde suele haber más hombres que mujeres, y que en los grupos 1 y 3 la mediana de edad fuera de 71 y 69 años, respectivamente, indicando poblaciones más envejecidas que las de otros estudios de referencia en la primera línea del CCRm (55)(61)(415)(416). La del grupo 2, donde por criterios de inclusión todos los pacientes habían recibido ≥ 1 línea de QT para la enfermedad avanzada y eran KRAS^{NAT}, es sin embargo, una población heterogénea variablemente pre-tratada (pacientes en progresión a 1, 2 o 3 líneas previas).

Por último, en el grupo 4 se incluyó a 14 pacientes con CCC de diferentes histologías y sublocalizaciones en los que se realizó el recuento de CTC por IsoFlux™ y se comparó el análisis mutacional de las CTC y del ADNtc empleando NGS y PCR digital. Se seleccionó esta patología con la intención de testar por primera vez la capacidad de IsoFlux™ para el enriquecimiento de CTC en un tumor con predominio de la histología epidermoide. Además, se incluyeron casos con otras histologías de origen epitelial (adenocarcinomas de origen salivar y de origen nasosinusal, y carcinoma de tipo neuroendocrino). Las características de la población del grupo 4 son similares a las descritas en la mayoría de los estudios de pacientes con CCC, observándose el predominio del sexo masculino, la distribución habitual por sublocalizaciones así como de los factores de riesgo habituales en esta entidad (tabaquismo y enolismo). No hubo ningún caso de cáncer de orofaringe HPV+, probablemente debido al pequeño tamaño muestral y a la menor incidencia que tiene aún esta entidad en España en comparación con los países del norte de Europa y USA (144)(149).

6.3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

La característica común de los 4 grupos de este estudio, es que en todos ellos se empleó el sistema IsoFlux™ para el aislamiento y recuperación de CTC. Se eligió IsoFlux™ como método de enriquecimiento por dos razones: 1) por ser un método de inmunoafinidad que emplea anticuerpos anti-EpCAM y que funciona con una placa de microfluído que incrementa la eficiencia del enriquecimiento, pudiendo ser, gracias a esta última característica, más eficiente que CellSearch®, el método considerado estándar, y único aprobado por la FDA, y que también basa la detección de CTC en la captura por inmunoafinidad frente a EpCAM; y 2) por permitir, a diferencia de CellSearch® y otros métodos de enriquecimiento, la recuperación de las CTC para su caracterización molecular (178)(182)(211)

(181)(229)(218)(219)(220)(221)(222)(223)(224)(225)(226)(227)(228)(417)(418).

En los pacientes con CCRm del grupo 1 se comparó la eficiencia en el recuento de CTC de los sistemas CellSearch® e IsoFlux™, mientras que en los grupos 2, 3 y 4 el objetivo no fue la comparación del recuento sino el empleo de IsoFlux™ para la recuperación de CTC y posterior análisis mutacional mediante diferentes técnicas. En los pacientes con CCRm de los grupos 1, 2 y 3 se realizó el aislamiento de CTC empleando, bien fuera con

CellSearch® o con IsoFlux™, anticuerpos de captura dirigidos a EpCAM, proteína de membrana ampliamente expresada en los cánceres de origen epitelial (419)(420). Para el aislamiento de CTC con el sistema IsoFlux™ en los pacientes con CCC de histología escamosa del grupo 4, además de emplear anticuerpos anti-EpCAM, se emplearon también anticuerpos anti-EGFR debido a la frecuente sobreexpresión de EGFR en esta entidad (136)(421). Hasta donde conozco, en pacientes con CCC, no se habían empleado previamente, ni la tecnología IsoFlux™ ni otros métodos de enriquecimiento de CTC con anticuerpos de captura dirigidos frente a EGFR.

6.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS MUTACIONAL EN CTC Y ADNtc

castPCR™

En los pacientes de los grupos 1 y 2 se empleó la tecnología castPCR™, que emplea sondas específicas de la mutación de interés a la vez que bloquea los alelos no mutados, permitiendo de esta manera incrementar la sensibilidad, siendo capaz de detectar hasta el 0.1% de alelos mutados en 10,000 copias de ADNg nativo (422)(423). Se eligió esta técnica de análisis mutacional al comprobar la baja sensibilidad de la tecnología estándar utilizada en tejido (RT-PCR Cobas o TheraScreen) y en base a los resultados de Harb y colaboradores (181), que habían empleado con éxito la tecnología castPCR™ para el análisis mutacional de KRAS en CTC recuperadas con IsoFlux™ en una serie de 14 pacientes con CCR en estadios II-IV.

BEAMing

En los pacientes del grupo 3, se comparó la detección de las mutaciones en RAS (KRAS y NRAS) entre el ADN libre circulante (ADNtc) y el ADN de las CTC empleando la tecnología BEAMing, la cual se considera, a día de hoy, el método de mayor sensibilidad para la identificación de mutaciones en “hot spots” o “puntos calientes”. La tecnología BEAMing tiene una sensibilidad de entre el 0.01% y 0.04% para la detección de mutaciones en RAS en ADNtc y varios estudios han demostrado una concordancia >70% entre el estatus de RAS en tejido y en ADNtc (317)(316)(319). Hasta donde conozco, la tecnología BEAMing no ha sido utilizada antes para la caracterización molecular de CTC en ningún tipo de cáncer, y de ahí el interés de emplearla para el análisis de CTC y compararlas con el ADNtc y el tejido.

PCR digital

En el grupo 4, se empleó la PCR digital para la detección de mutaciones en 2 loci concretos de PIK3CA en sendos pacientes con carcinoma de ducto salivar (CDS) metastásico durante el tratamiento con bloqueo androgénico combinado. La PCR digital tiene una sensibilidad del 0.1%-0.5% y ha sido ampliamente empleada en tejido, en ADNtc y algo menos en CTC, para la detección de mutaciones frecuentes en *loci* concretos en algunas entidades, como es el caso del CCRm RAS^{MUT}, el melanoma BRAF^{MUT}, el cáncer de pulmón EGFR^{MUT}, o el cáncer de mama PIK3CA^{MUT} (327)(190)(424)(425).

No obstante, en la mayoría de estudios empleando PCR digital para el análisis mutacional en CTC la concordancia con el tumor primario fue más baja que al comparar con el ADNtc, lo cual indica una sensibilidad insuficiente en comparación con el plasma, o que las CTC aportan información molecular diferente a la del ADNtc (186).

Secuenciación masiva (NGS)

En los pacientes del grupo 4 con CCC de tipo epidermoide, se empleó la secuenciación masiva (NGS) para el estudio de 15 genes frecuentemente mutados en esta entidad (113)(332). La NGS ha demostrado tener una sensibilidad de entre el 0.5% y el 1% para la detección de mutaciones, estando por ello especialmente indicada para la secuenciación masiva en tejido. Ha sido también empleada en ADNtc de plasma en CCR y en ADNtc tanto de plasma como de enjuagues orales en pacientes con CCC (316)(317)(318)(379). La tecnología SafeSeq, un tipo de NGS mejorada, ofrece una tasa de detección del 95% para una FAM del 0.05%, acercándose a la sensibilidad de la PCR digital con la ventaja de poder estudiar fragmentos grandes de un gen o incluso genes enteros. Esta tecnología, de reciente introducción comercial, demostró, empleando un panel de 4 genes (TP53, CDKN2A, PIK3CA y HRAS) en pacientes con CCC de histología epidermoide, una concordancia del perfil mutacional tejido-plasma del 51% y del 93% en el contexto no avanzado y recurrente/metastásico, respectivamente (382). En los pacientes del grupo 4 se decidió emplear la NGS como método de análisis mutacional en CTC y en ADNtc de plasma, ya que el CCC de histología escamosa se caracteriza por la ausencia de mutaciones frecuentes en “puntos calientes” o “hot spots”, siendo por ello más rentable una secuenciación completa o de regiones amplias de varios genes (113)(332). Aunque la NGS tiene una sensibilidad más baja que la PCR digital, varios

estudios han demostrado su utilidad para el análisis mutacional tanto en plasma como en CTC en distintas entidades (316)(317)(318)(379).

6.5. OBJETIVOS PRINCIPALES

- **Asociación de la supervivencia con variables clínicas y estatus de KRAS en los pacientes con CCRm del grupo 1**

En este estudio la SG fue significativamente más larga en los tumores con origen en el colon izquierdo mientras que la SLP fue mayor en los tumores del colon izquierdo estando próxima a la significación estadística ($p=0.082$). Estos resultados van en la línea de otros estudios de referencia donde se ha demostrado que el origen en el colon izquierdo confiere un mejor pronóstico (65)(66)(67)(68)(426)(69) (Véase **Tabla 3** en Introducción).

En el presente estudio la distribución del estatus de KRAS (KRAS^{MUT} vs KRAS^{NAT}) no varió en función de la lateralidad del primario (colon derecho (KRAS^{MUT}: 45%) vs izquierdo (KRAS^{MUT}: 45%)). Existen pocos estudios que hayan estudiado en profundidad el perfil molecular del CCR en función de la lateralidad del primario. En un estudio japonés de 77 pacientes con CCRm (13 derechos y 63 izquierdos) tratados dentro de ensayos fase II de 1ª línea con QT + cetuximab, la sobreexpresión de NOTCH1 se asoció a una mayor SG y SLP en los cánceres de colon izquierdo pero no en los del derecho. A su vez las firmas génicas de componentes subcelulares y de migración leucocitaria se asociaron a mayor supervivencia en los de colon derecho (427). Por el contrario, un estudio llevado a cabo en dos cohortes de 1876 y 608 pacientes con CCR mostró una continuidad cambiante a lo largo del colon, más que diferencias bruscas entre un lado y otro, no encontrando diferencias entre los tumores del colon transversal y los del colon izquierdo y si entre los primeros con los del colon derecho. No obstante, reconocen que la división actual entre colon derecho (hasta la flexura esplénica) e izquierdo es la que mejor diferencia a los pacientes desde el punto de vista pronóstico (428). Un análisis post-hoc recientemente publicado del estudio CALGB/SWOG 80405, observó que el subtipo CMS1 era más frecuente en los tumores del colon derecho mientras los subtipos CMS2, CMS3 y CMS4 eran más frecuentes en los tumores del colon izquierdo (29).

En nuestro estudio, la SG fue mayor en los pacientes con CEA dentro de valores normales y estuvo próxima a la significación estadística ($p=0.064$) en aquellos con CA 19.9 normal.

En una serie italiana de 892 pacientes con CCRm, niveles normales de CEA y CA 19.9 antes de iniciar la 1ª línea de QT, se asociaron a una SG y SLP significativamente mejores, demostrando tener valor pronóstico de manera independiente (429). En el estudio NORDIC-VII se analizó retrospectivamente el valor pronóstico de CEA y CA 19.9 en pacientes con CCRm antes del inicio de la 1ª línea, concluyendo que niveles elevados de estos dos marcadores se asociaban a una peor SG, siendo esta asociación especialmente llamativa en los pacientes con BRAF^{MUT} y CA 19.9 elevado (430).

En el presente estudio, la peor SG observada en las mujeres en el análisis univariante así como la peor SG y SLP observadas en el análisis multivariante, podrían deberse a que la mediana de edad en las mujeres fue mayor que en los hombres (72 vs 67 años) y a que en ellas fueron más frecuentes: el diagnóstico con complicaciones urgentes (obstrucción y/o perforación: 35% vs 28.5%) y en estadio metastásico (70% vs 64%), los primarios de colon derecho (45% vs 14.3%) y la presencia de > 1 localización metastásica en el momento de la extracción de CTC (55% vs 28.6%). Por el contrario el número de casos con enfermedad exclusivamente hepática en la extracción de CTC, y por tanto un escenario de mejor pronóstico, fue claramente inferior en las mujeres (15% vs 43%). (Véase resumen de las diferencias observadas entre hombres y mujeres en la **Tabla 45** más abajo). En dos estudios recientes, no hubo diferencias de supervivencia por sexo, aunque en uno de ellos, llevado a cabo en el Reino Unido, si se detectó un mayor número de casos diagnosticados por complicaciones urgentes (obstrucción, perforación) en las mujeres, en contraposición con los hombres que mayoritariamente fueron diagnosticados por métodos de cribado poblacional (colonoscopia, sangre oculta en heces). La mayor incidencia de complicaciones al diagnóstico podría indicar un estadio más avanzado asociándose ello a un peor pronóstico (431)(432).

Tabla 45. Diferencias observadas en diferentes características clínicas entre mujeres y hombres en el grupo 1.

GRUPO 1	MUJERES	VARONES
N	20	14
Edad (mediana y rango)	72 años (Min-max: 44-81)	67 años (Min-max: 42-82)
Estadio IV al diagnóstico	70% (14/20)	64% (9/14)
Obstrucción y/o perforación al diagnóstico	35% (7/20)	28.5% (4/14)
Enfermedad hepática exclusiva en CTC	15% (3/20)	43% (6/14)
> 1 localización metastásica en CTC	55% (11/20)	28.6% (4/14)
Primario de colon derecho	45% (9/20)	14.3% (2/14)

- **Comparación del recuento de CTC con CellSearch® e IsoFlux™ en pacientes con CCRm en el grupo 1**

Este es el primer y único estudio hasta la fecha que ha comparado los sistemas CellSearch® e IsoFlux™ para el recuento de CTC en pacientes con cáncer colorrectal. En los pacientes del grupo 1, IsoFlux™ detectó una mediana de 8 CTC frente a 1 CTC de CellSearch®, demostrando, así, mayor eficiencia en el enriquecimiento. Sin embargo, CellSearch® e IsoFlux™ mostraron una pobre correlación entre sí, que mejoró en presencia de metástasis pulmonares, si bien el número de casos fue muy reducido para extraer conclusiones firmes. Por otra parte, el diagrama de Bland-Altman mostró una baja concordancia entre los dos sistemas de recuento de CTC, de tal manera que a mayor número de CTC, mayor fue la diferencia en el recuento entre los 2 métodos de detección.

La escasa correlación y concordancia entre CellSearch® e IsoFlux™ en este estudio pudo deberse a que parte de las poblaciones de CTC detectadas fueran biológicamente diferentes. La capacidad de enriquecimiento de los sistemas de recuento de CTC basados en EpCAM, puede variar debido a factores cambiantes como la expresión de esta proteína de membrana en las CTC, las diferencias estructurales de los anticuerpos de captura utilizados por cada método y la existencia de otros elementos que incrementen el rendimiento, como la presencia de placas de microfluído, esto último propio del sistema IsoFlux™ (181)(433). En estudios con líneas celulares, nuestro grupo y otros autores han demostrado que IsoFlux™ detecta más CTC que CellSearch® cuando la expresión de EpCAM es baja, no existiendo diferencias entre los dos cuando la

expresión de EpCAM es intermedia o alta (181)(434). De esta manera, el fenómeno de la transición epitelio-mesénquima (TEM), frecuente en el CCRm, que confiere una mayor capacidad de invasividad y metástasis, y que se caracteriza por la pérdida de marcadores epiteliales como EpCAM, podría explicar, al menos en parte, las diferencias de recuento observadas entre CellSearch® e IsoFlux™ (20)(435).

- **Establecimiento de un punto de corte de CTC para predecir la supervivencia con cada sistema de detección en el grupo 1.**

CTC ≥ 3 fue establecido por otros autores como el mejor punto de corte para predecir la supervivencia con CellSearch® en el CCRm (210)(211)(417)(418)(172)(413)(171)(171), no existiendo, hasta este estudio, ninguno que haya establecido un punto de corte para predecir la supervivencia con IsoFlux™ en ningún tipo de cáncer (178)(182)(181)(229)(218)(219)(220)(221)(222)(223)(224)(225)(226)(227)(228).

En los pacientes del grupo 1, CTC ≥ 3 con CellSearch® y CTC ≥ 11 con IsoFlux™, se identificaron como los mejores puntos de corte para predecir la SG, la SG estimada a los 24 meses (SG-24m) y la SLP. El estadístico C de Harrell indicó, además, que IsoFlux™ ≥ 11 CTC, fue, al menos, tan buen predictor de supervivencia como CellSearch® ≥ 3 CTC. Aunque hubo una diferencia numérica clara en la SG y la SLP tanto con CellSearch® como con IsoFlux™ para sus respectivos puntos de corte, de tal manera que vivieron menos y progresaron antes los pacientes con CTC ≥ 3 con CellSearch® y con CTC ≥ 11 con IsoFlux™, no hubo, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas en la capacidad predictiva de los dos sistemas de recuento en base a estos puntos de corte, previamente seleccionados como aquellos con mejor capacidad de predicción. Aunque la correlación de cada sistema de recuento con los marcadores tumorales CEA y CA 19.9 fue pobre, cuando se analizó la capacidad predictiva de supervivencia con CellSearch® e IsoFlux™, medida por el valor del estadístico C de Harrell, en combinación con estos marcadores, se observó una mejoría de la capacidad predictiva de ambos sistemas de recuento para la SG y la SG-24 m, pero no para la SLP. Este hallazgo va en la línea de lo que otros estudios sobre biopsia líquida han demostrado empleando la combinación de ADNtc y marcadores proteicos, como es el caso de la tecnología CANCERSEEK que permite la identificación precoz, aunque con tasas de detección aún mejorables, de hasta 8 tipos diferentes de cáncer (271).

En el análisis multivariante, CellSearch® ≥ 3 CTC se asoció a una peor SLP y SG (para esta última sin alcanzar la significación estadística ($p=0.063$)), mientras que en el caso de IsoFlux™ ≥ 11 CTC fue al contrario. El hecho de que ni CellSearch® ≥ 3 CTC ni IsoFlux™ ≥ 11 CTC hayan demostrado en nuestro estudio ser factores independientes para predecir la SG podría deberse al reducido tamaño muestral. No obstante, CellSearch® ≥ 3 CTC sí predijo una peor SLP en el análisis multivariante y estuvo próximo a la significación estadística para predecir una peor SG, planteando la posibilidad de que CellSearch® sea una mejor herramienta pronóstica que IsoFlux™ en el CCRm. En las curvas COR de SG el AUC para CellSearch® fue 0.613 y para IsoFlux™ fue de 0.457, mientras que para la SG censurada a los 24 meses, el AUC para CellSearch® fue 0.577 y para IsoFlux™ fue de 0.500, valores que indican la pobre capacidad predictiva tanto de CellSearch® como de IsoFlux™ en nuestro estudio. Debido al pequeño tamaño muestral, que limita el poder extraer conclusiones, estos resultados deberían validarse en un estudio mayor.

- **Recuento de CTC y lateralidad del tumor primario en los pacientes del grupo 1**

Como ya se ha mencionado, en este estudio los pacientes con CCR con origen en el colon izquierdo tuvieron una supervivencia significativamente más larga que los de origen en el colon derecho, siendo esto acorde con lo ya publicado por varios autores (65)(66)(67)(68)(426)(69).

Debido a la importancia clínica del concepto de lateralidad del tumor primario, se decidió estudiar su asociación con el recuento de CTC. La mediana de CTC fue mayor en los tumores de origen en el colon izquierdo frente a los del colon derecho, siendo esta diferencia más evidente al realizar el recuento con IsoFlux™, y estando próxima, en este último caso, a la significación estadística (Véase **Tabla 22** en Resultados). Estos resultados están en desacuerdo con un estudio publicado recientemente por Nicolazzo y colaboradores (311), en el que en una serie de 84 pacientes con CCRm, CellSearch® detectó un mayor número de CTC en los tumores de colon derecho en comparación con los de colon izquierdo y recto. Por otra parte, en nuestro estudio se evaluó el valor pronóstico de la combinación del punto de corte de CTC de cada sistema de recuento con la lateralidad del tumor primario, observando una SG significativamente mayor para los tumores de colon izquierdo con CellSearch® CTC < 3 ($p=0.002$) y estuvo próxima a la

significación con IsoFlux™ CTC < 11 ($p=0.068$) (Véanse **Tablas 24, 25, 34 y 35, y Figuras 65 y 66** en Resultados). En el estudio de Nicolazzo y colaboradores (311) no aportaron datos de SG ni evaluaron el valor pronóstico del punto de corte de CTC con el sistema CellSearch®, pero si encontraron un mayor tiempo hasta la progresión en aquellos pacientes con cáncer de colon izquierdo CTC- frente a los CTC+, y sin embargo no hallaron diferencias entre los CTC+ o CTC- con origen en el colon derecho. Dado que este último estudio y el nuestro, son los únicos que han evaluado la relación entre las CTC y la localización del tumor primario, es preciso esperar a disponer de datos de estudios con mayor tamaño muestral para extraer conclusiones.

- **Recuento de CTC con IsoFlux™ en pacientes con CCRm en el grupo 3**

En el Grupo 3 se incluyó a 29 pacientes con CCRm quimio-naïve, en los que se extrajeron muestras de sangre para CTC antes de iniciar el tratamiento de primera línea. Sorprendentemente, la mediana de CTC con IsoFlux™ en este grupo, de características aparentemente similares a las del grupo 1, fue sensiblemente menor, detectándose una mediana de 3 CTC (rango 0-15) frente a 8 CTC (0-419) del grupo 1. No dispongo de una explicación clara para esta diferencia. No obstante, el empleo de diferentes tubos de extracción de sangre, EDTA en el grupo 1 y Streck en el grupo 3, estos últimos nunca empleados con anterioridad para el aislamiento de CTC por IsoFlux™, podría explicar las diferencias en el recuento entre estos dos grupos, aunque tampoco se puede descartar el impacto de otras características de las poblaciones de los grupos 1 y 3 no analizadas formalmente como, por ejemplo, diferencias en el volumen de enfermedad entre un grupo y otro. De hecho, en los pacientes del grupo 1, un mayor número de CTC se asoció a una mayor carga de enfermedad con ambos sistemas de recuento, si bien, esta asociación, fue más clara con IsoFlux™ (mayor número de localizaciones metastásicas, presencia de metástasis pulmonares y elevación del CA 19.9). Los resultados de nuestro estudio sugieren que tanto CellSearch® como IsoFlux™ detectan más CTC con mayor carga tumoral, y que el recuento de CTC por encima de los puntos de corte establecidos, se asocia a un peor pronóstico. El hecho de que las diferencias encontradas no fueran estadísticamente significativas en la mayoría de los casos, pudo deberse al reducido tamaño muestral, y, en mi opinión deberían confirmarse en un estudio prospectivo mayor. Un estudio encontró que el tratamiento previo con agentes anti-VEGF y anti-EGFR podría condicionar la eficiencia en la detección de CTC por CellSearch® (433).

Actualmente se desconoce si la eficacia de la detección con IsoFlux® puede ser modificada por las terapias dirigidas contra el EGFR o el VEGF. En cualquier caso el recuento de CTC por IsoFlux® en los grupos 1 y 3 de nuestro estudio se realizó siempre antes de iniciar cualquier tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada.

- **Detección y enumeración de CTC con IsoFlux™ en pacientes con CCC R/M de histologías de tipo epidermoide y no epidermoide.**

En este proyecto se empleó por primera vez IsoFlux™ para la detección de CTC en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (CCC). La intención fue estudiar la capacidad de IsoFlux™ para el recuento y recuperación de CTC en pacientes con cáncer de histología epidermoide, ya que previamente solo se había utilizado en adenocarcinomas y siempre fuera de la esfera del cabeza y cuello (ej: adenocarcinoma de colon, próstata y pulmón). Se incluyeron la mayoría de las sublocalizaciones e histologías epiteliales descritas en el CCC (epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma neuroendocrino), por lo que, a pesar del limitado tamaño muestral, el grupo 4 constituye una buena muestra de la diversidad de la patología. La mediana de CTC detectadas fue de 4, no existiendo diferencias aparentes en el número de CTC entre los casos de histología epidermoide y los no epidermoides, ni tampoco dependiendo del tipo de anticuerpo empleado para la captura con IsoFlux™ (anti-EpCAM ó anti-EpCAM + anti-EGFR). El porcentaje de detección de CTC en otros estudios en pacientes con CCC en los que se emplearon sistemas de detección por IA con anticuerpos anti-EpCAM, osciló entre el 12% y el 44% con medianas de recuento < 3 CTC en todos los casos, mientras que en nuestro estudio se detectaron CTC en el 80% de las determinaciones (20/25) y en el 93% (13/14) de los pacientes, siendo 4, como ya se ha mencionado, la mediana de CTC detectadas (339)(341)(344)(346)(347)(351).

6.6. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- **Estatus mutacional de KRAS en el tumor primario y en CTC en pacientes con CCRm de los grupos 1 y 2.**

Varios autores han propuesto que la cantidad mínima de ADN o límite de detección (LDD) para garantizar la operabilidad de los principales métodos de análisis mutacional de alta sensibilidad (castPCR™, PCR digital), sería la equivalente a ≥ 4 ó 5 CTC (182)(181). Ma y colaboradores (182), consiguieron detectar la variante 7 del receptor de andrógenos (ARV7) en ADN de tan solo 5 CTC recuperadas con IsoFlux™. Mediante estudios de spike-in en sangre de controles sanos, y en pacientes con CCRm, Harb y colaboradores (181), demostraron ser capaces de detectar mediante castPCR, mutaciones en KRAS en ADN de solo 4 CTC recuperadas previamente con IsoFlux™. La mediana de CTC detectadas con CellSearch® en nuestro estudio fue 1, es decir claramente por debajo del LDD de 4-5 CTC para el empleo de métodos de caracterización molecular de alta sensibilidad. Además de la baja eficiencia en el recuento, CellSearch® tiene la importante limitación de no permitir la recuperación de CTC para su análisis molecular salvo que se haga uso de un segundo y costoso dispositivo de recuperación de CTC acoplado al primero (258). En el grupo 1 de nuestro estudio, IsoFlux™ fue capaz de aislar una mediana de 8 CTC, y donde CellSearch® detectó ≥ 3 CTC, IsoFlux™ siempre detectó ≥ 30 CTC. De hecho, IsoFlux™ detectó ≥ 4 CTC en el 65% de los pacientes del grupo 1, mientras que CellSearch® lo hizo en el 20,5% de los casos, una diferencia relativa similar a la comunicada por el fabricante de IsoFlux™ (Fluxion Biosciences, CA, USA) en una serie de 22 pacientes con cáncer de próstata (181). Por lo tanto, en el grupo 1 de nuestro estudio, IsoFlux™ detectó en una mayoría de los pacientes, una cantidad de CTC por encima del LDD establecido para el análisis mutacional por castPCR™ o PCR digital.

Para probar si la mayor eficiencia en el aislamiento logrado con IsoFlux™ realmente permitía la realización de análisis genómicos, se emplearon, en muestras de CTC de pacientes con CCRm de los grupos 1, 2 y 3, un total de 4 métodos para el análisis mutacional de RAS con diferentes sensibilidades: cobas® RT-PCR, CLART® CMA multiplex PCR (mPCR), castPCR™ y BEAMing. Estos métodos tienen una sensibilidad $\geq 5\%$, $\geq 1\%$, $\geq 0,5\%$ y $\geq 0.02\%$, respectivamente, para la detección de mutaciones en KRAS

o en RAS total (62)(63)(408)(436)(437)(438)(439)(440). cobas® RT-PCR no encontró ninguna mutación de KRAS en CTC en 31 pacientes evaluados de los grupos 1 y 2 (17 del grupo 1 y 14 del grupo 2). CLART® CMA mPCR se empleó en muestras de CTC de 9 pacientes, encontrando solo 1 paciente KRAS^{MUT} en CTC. Dada la elevada discordancia entre el estatus de KRAS del tumor primario y el de las CTC en los pacientes estudiados mediante estos dos métodos, estos resultados no parecen ser fiables, probablemente debido a su baja sensibilidad. No obstante, nótese que, a diferencia de los pacientes estudiados por cobas® RT-PCR, la mayoría de los 9 pacientes evaluados con CLART® CMA mPCR tuvieron recuentos de CTC muy bajos lo que podría haber influido en la operabilidad del análisis mutacional. Al emplear en las CTC una tecnología más sensible (castPCR™), los porcentajes de concordancia (casos KRAS nativos y mutados) con el tumor primario estudiado mediante tecnología estándar (RT-PCR) o mediante castPCR™ oscilaron entre el 67% y 70% tanto en el grupo 1 como en el grupo 2. La concordancia solo para los casos KRAS^{MUT} al estudiar por castPCR™ tanto el tumor primario como las CTC alcanzó el 67% (6/9) en el grupo 1 y el 50% (2/4) en el grupo 2 (recuérdese que en este último grupo todos los pacientes eran, por definición, KRAS^{NAT} por metodología estándar (RT-PCR)). En los pocos y pequeños estudios de caracterización molecular de CTC en el CCR, los porcentajes de concordancia del estatus de KRAS entre el tumor primario y las CTC oscilan entre el 7% y el 81% según las series, si bien, en la mayoría, la concordancia supera el 50% (Véase **Tabla 46 a continuación**) (181)(229)(183)(303)(159)(305)(306)(309).

Tabla 46. Estudios sobre la concordancia del análisis mutacional de RAS y otros genes entre el tumor y las CTC.

Autor	Sistema de detección de CTC	N	Tasa de detección de CTC	Técnica de análisis mutacional	Tasa de concordancia (Tumor vs CTC)
Matikas (2017)(303)	ISSET (tamaño)	15 CCR IV RAS & BRAF NAT	63%	qPCR	RAS ^{NAT} pre-Cx: 73% RAS ^{NAT} post-Cx: 62.5%
Kidess-Sigal (2016)(159)	Centrifugación tipo Vórtex no dirigida	15 CCR IV	Muestras: 80% (81.4% CTC EpCAM+)	Secuenciación Sanger	KRAS ^{MUT} : 78.2% BRAF ^{MUT} : 73% PIK3CA ^{MUT} : 91.3%
Suhaimi (2015)(305)	Detección por tamaño y microfiltración	44 CCR estadios II-IV	-	HRM & PCR alelo-específica	Estatus KRAS: 81% Estatus BRAF: 99.9%
Kalikaki (2014)(183)	CellSearch	31 CCR IV PIK3CA y BRAF NAT	Muestras: 65% Pacientes: 74%	qPCR basada en péptidos de ácidos nucleicos	KRAS ^{MUT} : 45%
Shigeyasu (2015)(306)	Aislamiento CTC vivas empleando adenovirus atenuado	8 CCR KRAS ó BRAF MUT	100%	ASB-PCR	KRAS ^{MUT} : 12.5% (1/8) BRAF ^{MUT} : 12.5% (1/8)
Harb (2013)(181)	IsoFlux (IA en sistema microfluído)	14 CCR II-IV	87%	castPCR	Estatus KRAS: 57% (8/14) KRAS ^{NAT} : 50% (7/14) KRAS ^{MUT} : 7% (1/14)
Yen (2009)(309)	Matriz de membrana específico para KRAS	76 CCR Folfiri-Cetuximab vs Folfx4-Cetuximab	39.5%	Secuenciación directa mediante matriz de membrana específico para KRAS	Estatus KRAS: 91% (69/76) KRAS ^{MUT} : 85% (28/33)
Onstenk (2016)(229)	CellSearch	23 CCR IV con mtx hep	-	RT-qPCR de 25 genes	Tumor 1º vs CTC: 57% (13/23) Metástasis vs CTC: 74% (17/23)
Estudio actual	IsoFlux	G1: 34 CCR IV G2: 22 CCR IV G3: 29 CCR IV	G1: 79% (27/34) G2: 100% (3/3) G3: 86% (25/29)	castPCR (G1, G2) BEAMing (G3)	Estatus KRAS G1: 70% (7/10) Estatus KRAS G2: 67% (10/15) Estatus KRAS G3: 58% (7/12)

BEAMing: Beads, emulsion, amplification and magnetics, castPCR: competitive allele specific Taqman PCR, CCR: cáncer colorrectal, CTC: células tumorales circulantes, Cx: cirugía, G1: grupo 1, G2: grupo 2, G3: grupo 3, HRM: high-resolution melting, IA: método de detección por inmunoafinidad, ISSET: método de "aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales" (por sus siglas en inglés), NAT: nativo, MUT: mutado, qPCR: PCR cuantitativa, RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real, (-): información no disponible.

A través de experiencias previas de nuestro grupo (ver Introducción) y de acuerdo a los informes de otros autores, nuestro laboratorio estableció el umbral de detección por castPCR™ de las mutaciones en KRAS (dCt KRAS) en 21, de modo que las variantes con un dCt <21 se consideraron mutaciones reales (181)(436). Se consideraron también como mutaciones altamente probables aquellas que, aún teniendo un dCt ≥ 21 , fueron detectadas en 2 o más muestras diferentes de un mismo paciente. De acuerdo con esto, castPCR™ detectó mutaciones de KRAS en CTC en 9 (36%) de los 25 pacientes estudiados de los grupos 1 y 2. En estos mismos pacientes estudiados por RT-PCR en el tumor y por castPCR™ en CTC, la concordancia de casos KRAS^{MUT} en las dos muestras fue del 24%. Sin embargo, cuando se empleó castPCR™ en el tumor y en las CTC, la concordancia de casos KRAS^{MUT} fue del 42% en los 19 pacientes estudiados de ambos grupos. Estos resultados, van en la línea de los reportados por Harb y colaboradores (181), quienes detectaron mutaciones en CTC por castPCR™ en el 47% de una serie de 15 pacientes con CCR en estadios I-IV, con una tasa de concordancia con el tumor primario del 7%, este último estudiado por métodos estándar (RT-PCR y secuenciación Sanger). Cuando en los grupos 1 y 2, se estudió el estatus de KRAS por métodos de secuenciación estándar (Cobas o TheraScreen), sólo hubo 1 caso KRAS^{MUT} concordante entre el tumor primario y las CTC, mientras que en el estudio de Harb y colaboradores no se detectó ninguna mutación concordante entre las dos muestras (181). Sin embargo, cuando en nuestro estudio, se empleó castPCR™ en el tumor y en CTC, se detectó la misma mutación en las dos muestras en el 57% y en el 25% de los pacientes KRAS^{MUT} concordantes de los grupos 1 y 2, respectivamente. Así como en el estudio de Harb y colaboradores (181), en los casos KRAS^{MUT}, castPCR™ detectó únicamente una mutación por paciente, en el presente estudio castPCR™ detectó ≥ 2 mutaciones en el tumor en el 42% de los casos y en las CTC en el 8% de los casos. En la mayoría de estos casos el dCt de la mutación fue < 21 y en varios casos se detectaron las mismas mutaciones en varias muestras del tumor, sugiriendo que la tecnología castPCR™ es capaz de detectar clonas tumorales diferentes, que serían reflejo de la heterogeneidad tumoral. La reactividad cruzada descrita entre las sondas de castPCR™ para las mutaciones G12S, G12D y G13D de KRAS, hace referencia a la detección errónea de alguna de estas mutaciones en lugar de otra de ellas, pero no explica la detección de varias mutaciones

en una misma muestra (436). Por otra parte, otros estudios en CCR han descrito la coexistencia de varias mutaciones en RAS tanto en el tumor como en las CTC, siendo esto probablemente el reflejo de la heterogeneidad tumoral (185)(159)(307). Asimismo, varios autores han descrito la presencia de mutaciones en CTC y en ADNtc no observadas en el tumor por técnicas estándar pero si detectables a nivel subclonal mediante tecnología de alta sensibilidad empleada para las CTC o el ADNtc (267)(183)(185)(283)(326)(275)(325). Así, tanto las CTC como el ADNtc han demostrado ser capaces de identificar clonas tumorales existentes en pequeño número, pero que podrían condicionar la aparición de resistencia primaria o adquirida al tratamiento. Ejemplo de ello, es la emergencia de mutaciones en RAS detectadas en CTC y/o en ADNtc que aumentan o disminuyen en función de la presencia o no de agentes anti-EGFR en pacientes con CCRm (Véase **Tabla 47 a continuación**) (275)(276)(319)(323)(327)(329). En nuestro estudio, al no haber realizado seriación a lo largo de la exposición al tratamiento anti-EGFR no es posible demostrar tal fenómeno. No obstante, en varios pacientes del grupo 2 (por definición todos KRAS^{NAT} en tumor y en progresión a terapia anti-EGFR) se detectaron mutaciones de KRAS en CTC que podrían reflejar la emergencia de subclonalidad KRAS mutada ante la presión terapéutica. En este mismo sentido, en uno de los pacientes del grupo 4, afecto de un adenocarcinoma nasofaríngeo de tipo intestinal, se pudo demostrar cómo la clonalidad RAS^{MUT} detectada por BEAMing -pero no detectada por RT-PCR estándar-, fue aumentando en las muestras de tejido obtenidas a lo largo de 3 años, y fue detectada en CTC, pudiendo explicar la no respuesta al tratamiento con CPT-11 y cetuximab (414).

Tabla 47. Estudios con ADNtc y con CTC que describen la aparición de clonalidad RAS mutada en pacientes con CCR RAS nativo.

Autor	N	Tecnología	Conclusiones
Vidal (2017)	115 CCR IV	Estatus RAS por BEAMing en tejido y ADNtc	Concordancia 93% Detección de mutación en RAS anticipó respuesta radiológica Detección de clonas RAS mutadas como mecanismos de resistencia a anti-EGFR
Tabernero (2015)	503 CCR IV tratados con regorafenib (Estudio CORRECT)	BEAMing (KRAS, PIK3CA, BRAF) en ADNtc	-De los 86 pts KRAS ^{NAT} en tumor tratados con anti-EGFR el 48% KRAS ^{MUT} en ADNtc -Beneficio de regorafenib fue diferente según estatus KRAS y PIK3CA en ADNtc
Morelli (2015)	62 CCR IV en PD a anti-EGFR	BEAMing (KRAS, EGFR) en ADNtc	-Detección nuevas muts en plasma en KRAS en 44% y en EGFR en 8% -FAM > a < tiempo transcurrido desde último anti-EGFR -Detección de muts en KRAS en tumor se asoció < SLP (resistencia) a anti-EGFR -FAM cambiante en función de presión terapéutica por anti-EGFR
Misale (2012)	10 CCR IV tratados con anti-EGFR	PCR digital	-Detección de muts en KRAS en plasma en 60% durante el tto con anti-EGFR anticipando PD radiológica
Díaz (2012)	28 CCR IV KRAS ^{NAT} tratados con Panitumumab en monoterapia	PCR digital	-Detección de muts en KRAS en plasma en 38% durante el tto con panitumumab -3 pts múltiples muts en KRAS en plasma -Muts aparecieron a los 6 m del inicio del tratamiento con panitumumab, aunque presentes en el tumor a nivel subclonal
Siravegna (2015)	CCR IV en tto con anti-EGFR	PCR digital	-FAM de KRAS en plasma disminuía al suspender el tto y volvía a aumentar al reintroducirlo y viceversa
Onidani (2019)	7 CCR IV pre-tto con anti-EGFR y en PD	CTC vs ADNtc mediante NGS	-Mayoría de mutaciones detectadas en momento de PD -Detección de mutaciones en CTC y ADNtc en 2/7 casos
Matikas (2017)	15 CCR IV RAS ^{NAT} & BRAF ^{NAT}	Detección CTC: ISET Análisis mutacional: PCR digital	Mutaciones KRAS exón 2 qPCR en CTC: 60% ≥ 1 muestra de CTC KRAS ^{MUT} -Pre-Cx: 27% CTC KRAS ^{MUT} -PD: 37.5% CTC KRAS ^{MUT} -Mut > frec en CTC: G13D, G12C
Estudio actual	G1: 34 CCR IV QT-naïve G2: 22 CCR IV KRAS ^{NAT} en PD a anti-EGFR G3: 29 CCR IV QT-naïve G4: 1 CCC ADTI R/M	Detección de CTC por IsoFlux Análisis KRAS en CTC mediante castPCR	G1: 2/6 pts KRAS ^{NAT} en tejido KRAS ^{MUT} en CTC G2: 3/10 pts KRAS ^{NAT} en tejido KRAS ^{MUT} en CTC G3: 1/5 pts KRAS ^{NAT} en tejido KRAS ^{MUT} en CTC G4: 1/1 pts KRAS ^{NAT} en tejido KRAS ^{MUT} en CTC

ADTI: adenocarcinoma de tipo intestinal de origen nasoetmoidal, CCC: cáncer de cabeza y cuello, CCR: cáncer colorrectal, CTC: células tumorales circulantes, Cx: cirugía, EGFR: epidermal growth factor receptor, FAM: fracción alélica mutada, G1, G2, G3, G4: grupos 1, 2, 3 y 4, IA: método de detección por inmunofluorescencia, MUT: mutado, NAT: nativo, NGS: secuenciación masiva, qPCR: PCR cuantitativa, PD: progresión, R/M: fase recurrente y/o metastásica, RT-PCR: PCR en tiempo real, SLP: supervivencia libre de progresión, SG: supervivencia global.

También creo de importancia discutir la detección en algunos casos de nuestro estudio la presencia de varias mutaciones diferentes en una misma muestra bien de tejido y/o de CTC. En 1 de los pacientes del grupo 1 (**HCSC-1-11**), castPCRTM detectó las mismas 3 mutaciones en KRAS al estudiar la biopsia endoscópica del tumor primario y la pieza de la hemicolectomía llevada a cabo 6 meses después del diagnóstico, tras varios ciclos de quimioterapia perioperatoria para la resección de metástasis hepáticas y del tumor

primario. El debut en fase metastásica y la detección de varias mutaciones en KRAS, podría indicar que se trata de un tumor agresivo por su heterogeneidad biológica con varias clonas KRAS^{MUT}. En otro paciente del grupo 1 (**HCSC-1-12**), se detectaron las mismas 3 mutaciones tanto en la pieza quirúrgica del cáncer de recto como en la biopsia endoscópica de la recaída local que se produjo 12 meses después. Aunque el dCt no estuvo en todos los casos por debajo del punto de corte para considerarlas indudablemente mutaciones reales, el hecho de que se detectaran exactamente las 3 mismas mutaciones en 2 muestras diferentes, sugiere que se trata de mutaciones verdaderas en un tumor biológicamente heterogéneo, y no de un error de la técnica (Véase **Tabla 34** en Resultados). Por último, en 3 pacientes del grupo 2 (HCSC-2-06, HCSC-2-09, HUPH-2-20) se detectaron 2, 3 y 4 mutaciones diferentes de KRAS en el tumor, alguna de las cuales fue detectada posteriormente en CTC (Véase **Tabla 35** en Resultados). Estos 3 pacientes y 1 de los pacientes descritos del grupo 1 eran KRAS^{NAT} en el tumor por tecnología estándar, pero fueron KRAS^{MUT} por castPCRTM, lo que significa que el porcentaje de celularidad KRAS^{MUT} en estos tumores se encontraba entre el 1% y el 5%, que son los umbrales de detección de mutaciones para castPCRTM y para las técnicas estándar de RT-PCR, respectivamente. En otras palabras, se trata de porcentajes muy bajos de celularidad KRAS^{MUT}, cuya proliferación pudo haberse visto favorecida por la presión terapéutica. En uno de los casos del grupo 2 (HCSC-2-09) el paciente había recibido 20 ciclos de FOLFIRI-Cetuximab (era KRAS^{NAT} en el tumor por RT-PCR) antes de producirse la progresión y de que se realizara la extracción de las CTC. castPCRTM detectó 4 mutaciones diferentes en el tumor y una mutación en CTC no detectada en el tumor, sugiriendo que la presión terapéutica podría haber contribuido a hacer visible la celularidad KRAS^{MUT} en sangre, como otros autores han demostrado en estudios con agentes anti-EGFR en CCR (275)(276)(319)(323)(327)(329). En un segundo paciente del grupo 2 (HUPH-2-20), con alta carga tumoral (metástasis hepáticas, pulmonares y carcinomatosis peritoneal) tratado con 5 ciclos de FOLFOX-Bevacizumab, castPCRTM detectó 3 mutaciones en el tumor y 2 mutaciones en CTC, siendo una de ellas coincidente en las dos muestras. Todos estos casos apoyan el concepto de la heterogeneidad intratumoral como un rasgo característico del CCR y demuestran la capacidad de detectar esta heterogeneidad en las CTC empleando sistemas de enriquecimiento de alta eficiencia como IsoFluxTM y de alta sensibilidad para

el análisis mutacional como la castPCR™ (275)(276)(319)(323)(327)(329) (Véanse **Tablas 34-36 y Figuras 68-71** en Resultados). Aunque se desconoce si el tratamiento con bevacizumab puede favorecer el aumento de la clonalidad RAS^{MUT}, sí se ha demostrado que la quimioterapia convencional puede incrementar la heterogeneidad intratumoral y conferir un fenotipo tumoral más agresivo (441)(442). Aunque, como ya se ha mencionado, se dispone ya de pequeños estudios que han estudiado cómo la presión terapéutica condiciona la emergencia de clonalidad RAS^{MUT} detectable en sangre periférica, son necesarios estudios más grandes y tecnológicamente potentes para conocer de qué manera los agentes anti-EGFR, los antiangiogénicos, y otros tratamientos, pueden condicionar la selección de celularidad RAS^{MUT} en pacientes con CCR RAS^{NAT}.

El presente trabajo y los estudios de otros autores, aunque aún escasos en número y con muestras pequeñas, vienen a refrendar la observación de que la biopsia líquida, puede ser una herramienta útil para explorar la heterogeneidad tumoral evitando el sesgo espacial de la biopsia tradicional en tejido (275)(185)(326)(414) (Véase **Tabla 47**).

- **Relación del estatus de KRAS en tejido y en CTC con la lateralidad y sublocalización del tumor primario en el grupo 1**

Si bien no se realizaron comparaciones estadísticas formales debido al reducido tamaño muestral, en nuestro estudio no se aprecian diferencias respecto al estatus mutacional de KRAS en función de la lateralidad (colon izquierdo vs derecho) del tumor primario ni en cuanto a la sublocalización (colon vs recto). Tampoco se observan diferencias en el estatus mutacional de KRAS en CTC en función de la lateralidad del tumor primario. Son escasos los trabajos y, además con resultados dispares y limitándose solamente al análisis en tejido y no en biopsia líquida, que hayan analizado la relación del perfil molecular con la sublocalización y lateralidad del primario. El consorcio TCGA, analizó diferentes aspectos de la genómica del CCR relativos al perfil y carga mutacionales, amplificaciones, translocaciones, patrón de metilación, y regulación de vías de señalización, en una serie retrospectiva de 276 casos, 62 de los cuales eran cánceres de recto. No se encontraron diferencias entre los cánceres de recto frente a los de colon aunque si observaron mayor frecuencia de tumores hipermutados e hipermetilados en los de origen en el colon derecho (443). Otro estudio que incluyó a 57, 87 y 145

pacientes con cánceres de colon derecho, colon izquierdo y recto, respectivamente, no encontró diferencias en el estatus mutacional de KRAS ni BRAF ni tampoco en la expresión de varios marcadores proteicos como MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, β -Tubulina III, P53, Ki67 y TOPII α (444).

En otro estudio realizado en 13.336 CCR en estadio metastásico analizados por secuenciación masiva (NGS) de 315 genes mediante el test FoundationOne (FM Inc., Cambridge, MA, USA), se identificaron mutaciones en KRAS, NRAS y HRAS no descritas previamente, así como diferencias en la frecuencia del perfil mutacional de estos genes entre los cánceres de colon y de recto y entre los pacientes menores y mayores de 40 años (445).

- **Comparación del estatus mutacional de KRAS y NRAS en CTC y en ADNtc en pacientes con CCRm del grupo 3.**

Hasta donde conozco, el presente estudio es el primero en el que se empleó la tecnología BEAMing para el análisis de mutaciones en RAS en ADN de CTC. Mediante la mezcla de diferentes concentraciones de ADN KRAS^{MUT} y KRAS^{NAT} procedente de líneas celulares, BEAMing detectó la mutación de KRAS en el ADN equivalente a una proporción de células KRAS^{MUT} de tan solo el 0.2% (10 células KRAS^{MUT} mezcladas con 5000 células KRAS^{NAT}). Posteriormente en estudios de spike-in empleando una línea celular KRAS^{MUT} en sangre de controles sanos, tras recuperar las CTC con IsoFluxTM y posteriormente purificar la muestra con CellCelectorTM, BEAMing detectó la mutación en KRAS incluso con 1 única CTC en la muestra. Por último, en los pacientes estudiados por BEAMing en plasma y en CTC (grupo 3), se detectaron mutaciones de RAS en CTC en el 33% (5/15) de ellos. Se encontró una concordancia del estatus de RAS entre el primario y el plasma del 91% (21/23), entre el primario y las CTC del 58% (7/12), y entre el plasma y las CTC del 64% (7/11), si bien, de los 2 casos mutados en CTC y en plasma el “hot spot” fue concordante sólo en 1 de ellos (Véanse **Tablas 39 y 40** en la sección de Resultados). Estos resultados demuestran una elevada concordancia en el estatus de RAS entre el tumor primario y el plasma cuando este último es estudiado mediante BEAMing, y es comparable a la ya comunicada previamente por otros autores (Véase **Tabla 9** en la sección de Introducción) (283)(316)(317)(319)(323). Sorprende, que la elevada concordancia encontrada en el estatus de RAS entre el tumor primario y el plasma, no se reprodujo entre el primario y las CTC ni entre el plasma y las CTC, lo cual

podría explicarse por una insuficiente sensibilidad de la tecnología BEAMing al emplear recuentos bajos de CTC, o, como han propuesto algunos autores, a que las CTC y el plasma aporten información de áreas o localizaciones tumorales diferentes y tratarse, por tanto, de información complementaria (159). Esto explicaría también, la baja concordancia en el locus de la mutación detectada entre el plasma y las CTC y entre el primario y las CTC en los casos RAS^{MUT} concordantes. En el único paciente en el que la muestra de CTC recuperadas con IsoFlux™, fue posteriormente purificada mediante CellCelector™, se detectaron mutaciones diferentes en el plasma y en las CTC, si bien el estatus RAS^{MUT} fue coincidente entre las tres muestras (tumor, ADNtc y CTC), siendo este, por tanto, un ejemplo de cómo la información molecular aportada por cada uno puede ser complementaria. No obstante, estos resultados son provisionales, a la espera de completar el reclutamiento del estudio y de llevar a cabo el estudio del tumor por BEAMing. En los pacientes con CCRm de los grupos 1 y 2, las CTC se recolectaron en un solo momento, no pudiendo realizarse la monitorización de la enumeración de las CTC y evaluar la dinámica molecular a lo largo de la enfermedad. A fecha de redacción de esta memoria, se está realizando un subestudio en los pacientes del grupo 3 con tumor primario RAS^{NAT} consistente en una segunda extracción de plasma y de CTC para el análisis mutacional de KRAS y NRAS en el momento de la progresión a agentes anti-EGFR, siendo aún pocos los casos en que esta se ha producido debido a que el estudio se inició en el año 2017, el reclutamiento ha sido más lento de lo previsto, y a que la mediana de tiempo de progresión en estos pacientes se estima en 10 - 11 meses (61)(63)(415).

- **Estudio mutacional en CTC y en ADNtc en pacientes con CCC R/M del grupo 4.**

A diferencia de los pacientes con CCR (1, 2 y 3), en los adenocarcinomas del grupo 4 se realizaron extracciones de sangre repetidas para monitorizar la enfermedad. Además, se llevó a cabo la caracterización molecular empleando dos tecnologías no empleadas en ninguno de los grupos de pacientes con CCR: la PCR digital y la NGS. La PCR digital se ha empleado para la caracterización molecular de CTC recuperadas con IsoFlux solo en un estudio previo, en pacientes con cáncer de próstata, permitiendo detectar la variante 7 del RA en 8/14 pacientes con CPRC (182). La NGS fue empleada para el análisis mutacional de CTC recuperadas con IsoFlux solamente en otros tres estudios, uno de 20 pacientes con cáncer de vejiga, otro de una serie de 15 pacientes con cáncer de próstata

y cáncer renal y un tercer estudio en 10 pacientes con carcinoma microcítico de pulmón. Se detectaron mutaciones en ADN de CTC mediante NGS hasta en el 50% de los pacientes (223)(224)(446).

En nuestro estudio se demuestra cómo en 2 de los 5 pacientes con histología no epidermoide fue posible detectar la mutación encontrada en el tumor primario (mutación en KRAS en un caso de adenocarcinoma de tipo intestinal de origen nasotmoidal y mutación en PIK3CA en dos casos de CDS) en el ADN de CTC empleando dos tecnologías diferentes, la castPCR y la PCR digital y en uno ellos en dos determinaciones seriadas (Véase **Tabla 43** en Resultados). En el 100% de los pacientes con tumores de histología epidermoide y en el 54.5% de las determinaciones (6/11), la NGS pudo detectar mutaciones en ADN de CTC, encontrando 1 misma variante coincidente en 6/7 pacientes (NOTCH2 splicing (NM_024408.3:c.74-2A>G)). Al tratarse de la misma variante en los 6 casos, y a pesar de estar catalogada como probablemente patogénica por diversos predictores *in silico*, no se puede descartar que, en realidad, se trate de una variante no específica del tejido tumoral de origen, y pueda tratarse de una variante de la normalidad (447)(448). El plasma reveló en la mayoría de casos, mayor número de variantes que las CTC. Aunque el número de variantes posiblemente patogénicas identificadas en plasma y en CTC no fue bajo, cabe destacar que se realizó una selección muy restrictiva de las mismas, empleando para ello varios filtros distintos y catalogándolas finalmente como variantes con potencial patogénico si existía consenso de al menos 2 predictores *in silico*. Por tanto, es posible, que no se hayan identificado como patogénicas algunas variantes que en realidad si lo eran (447)(448). Estos resultados se deben tomar con cautela, dado el limitado tamaño muestral, y a la espera de realizar el análisis comparativo con el tumor primario. La NGS no había sido empleada con anterioridad para la caracterización molecular de las CTC en pacientes con CCC mediante ningún tipo de sistema de enriquecimiento.

6.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- **Tamaño muestral**

Soy consciente de varias limitaciones en este estudio. En primer lugar el reducido tamaño muestral pudo haber afectado a los resultados, particularmente a la hora de evaluar la capacidad predictiva de la supervivencia de los puntos de corte seleccionados

tanto para CellSearch como para IsoFlux en los pacientes con CCRm del grupo 1. Sin embargo, el que el punto de corte identificado como mejor predictor para CellSearch (≥ 3 CTC), sea el mismo que el previamente establecido en la literatura, apoya los resultados del análisis estadístico llevado a tal efecto en este estudio.

La mediana de recuento de CTC de cada sistema de enriquecimiento también pudo haberse visto afectada por el reducido tamaño muestral. Sin embargo, el porcentaje de detección de CTC y el número de CTC con CellSearch en los grupos 1 y 2 fue similar al comunicado por otros autores en estudios previos (210)(413). Aparte del presente trabajo, sólo existe otro llevado a cabo con IsoFlux en CCRm, en una muestra heterogénea de 15 pacientes, por lo que es difícil establecer comparaciones (181). Por otra parte, la mediana de CTC con IsoFlux fue diferente entre los pacientes con CCRm de los grupo 1 y 3, a pesar de estar constituidos por dos poblaciones aparentemente similares (QT-naïve para la enfermedad avanzada). A diferencia del recuento relativamente bajo de CTC en el grupo 3, el del grupo 1 fue más parecido al del estudio de referencia del fabricante (181). Estas diferencias podrían deberse a diferencias no analizadas formalmente entre las poblaciones de los grupos 1 y 3, si bien todos eran pacientes no preseleccionados por el estatus de RAS y no tratados con quimioterapia en el contexto avanzado. Por otra parte, como ya se ha mencionado, los diferentes tipos de tubos de extracción de sangre empleados en un grupo y en otro podrían explicar la diferencia en el recuento. De hecho en el grupo 1 y en el estudio de referencia del fabricante de IsoFlux, se emplearon tubos EDTA mientras que en el grupo 3 se emplearon tubos Streck (181).

- **Técnicas de análisis molecular**

El reducido tamaño muestral hace difícil extraer conclusiones firmes del análisis de RAS por BEAMing en CTC, estando aún pendiente de completarse el análisis de parte de los pacientes ya incluidos y de completar el reclutamiento. Asimismo, se va a proceder a estudiar las muestras del tumor primario por BEAMing para así poder comparar el resultado con el del plasma y el de las CTC.

El limitado tamaño muestral también obliga a la cautela a la hora de extraer conclusiones del recuento de CTC con IsoFlux en los paciente con cáncer de cabeza y cuello, teniendo en cuenta que, además, se incluyeron dos grupos histológicos diferentes, si bien no se encontraron diferencias aparentes en el recuento de CTC entre

uno y otro. La escasa concordancia entre las variantes encontradas por NGS en el plasma y en las CTC pudo deberse al reducido tamaño de la muestra, pero también al hecho de que, al igual que al estudiar las mutaciones en RAS en CTC y plasma por BEAMing, en realidad, las CTC y el ADNtc aporten información biológica diferente aunque complementaria. Al igual que en que en el grupo 3, en los pacientes con CCC del grupo 4, tampoco se comparó mediante la misma técnica de análisis molecular el tumor primario y la biopsia líquida, y eso impidió evaluar la concordancia entre las variantes originales en el tumor sólido y en el plasma y en las CTC. El estudio del tumor primario se ha iniciado ya, estando a la espera de los resultados en el momento de redacción de esta memoria.

- **Muestras seriadas**

Otra limitación de nuestro estudio es el no haber podido realizar la extracción de CTC de manera seriada salvo en algunos pacientes con CCC del grupo 4. La seriación de CTC podría ser útil para conocer los cambios en el recuento y en el perfil molecular que se producen a lo largo del tiempo y como conssecuencia de los tratamientos.

6.8. FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Nuestros resultados demuestran la viabilidad del recuento de CTC por IsoFlux en pacientes con CCRm tratados o no con quimioterapia para la enfermedad avanzada. Confirman que IsoFlux es más eficiente en el recuento de CTC que CellSearch en pacientes con CCRm, y que a diferencia de este último es capaz de recuperar CTC para su posterior caracterización. Los resultados de este estudio también confirman y, en el último caso de los enumerados a continuación, demuestran por vez primera, que el análisis mutacional de KRAS y de RAS total se puede llevar a cabo en CTC recuperadas por IsoFlux empleando diferentes técnicas de secuenciación de alta sensibilidad, como castPCR o BEAMing (283). Nuestro estudio demuestra, también por primera vez la viabilidad de la detección y recuperación de CTC por IsoFlux en pacientes con CCC, siendo también el primer estudio realizado con IsoFlux en pacientes con cualquier tumor de histología epidermoide. Por último, se trata del segundo estudio que ha empleado la PCR digital en CTC recuperadas por IsoFlux, y del tercero que utilizó la NGS para el análisis mutacional en CTC recuperadas con IsoFlux.

Este trabajo demuestra también la viabilidad de la caracterización molecular del cáncer mediante las CTC cuando se emplean tecnologías de alta eficiencia en el recuento y de alta sensibilidad en el análisis mutacional. Las ventajas de las CTC como herramienta diagnóstica son fácilmente identificables a través de nuestro estudio: la facilidad de su obtención mediante una simple extracción de sangre, permitiendo extracciones seriadas para la monitorización de la enfermedad, su utilidad para el descifrado de la heterogeneidad intratumoral con mayor fiabilidad que una biopsia tradicional (449). Finalmente, estas tecnologías deben usarse para realizar análisis mutacionales en biopsias de tumores sólidos con el fin de revelar su heterogeneidad genética e, idealmente, asociar los resultados a la información proporcionada por las biopsias líquidas.

6.9. PERSPECTIVA FUTURA

Las CTC constituyen una de las fuentes de información con un mayor potencial, al permitir el estudio del elemento biológico por excelencia en un cáncer que es la célula tumoral y no únicamente parte de sus componentes como ocurre con otras modalidades de biopsia líquida. Sin embargo, se requieren aún de avances importantes que simplifiquen su estudio y reduzcan los costes. En mi modesta opinión, la biopsia líquida del futuro estará constituida por el empleo conjunto de varias de las modalidades de las que ahora disponemos y de otras nuevas que vendrán, siendo la combinación de todas o parte de ellas las que aporten una información más sensible y refinada para la práctica clínica. Por otra parte, la implantación definitiva de la biopsia líquida en Oncología pasa por el obligado conocimiento por parte del clínico de dos aspectos fundamentales: a) la biología molecular del cáncer y b) los fundamentos biológicos y biotecnológicos para el empleo de cada modalidad de biopsia líquida.

Áreas de especial interés en las que desarrollar y/o refinar la biopsia líquida son:

- 1) el diagnóstico precoz del cáncer incluso desde fases pre-malignas.
- 2) su utilidad para evaluar la enfermedad mínima residual y orientar el tipo de tratamiento adyuvante en el contexto no avanzado.
- 3) el estudio de la *historia natural molecular* del cáncer a través de biopsias líquidas seriadas desde el primer diagnóstico hasta la fase final de la enfermedad

4) la utilidad de la biopsia líquida en el descifrado de la heterogeneidad intratumoral con el fin de identificar las estirpes celulares con mayor capacidad de supervivencia, invasividad y metástasis.

El desarrollo y validación de las diferentes modalidades de biopsia líquida obligan a su incorporación como un objetivo no secundario, sino primario o co-primario, en los ensayos clínicos de evaluación de fármacos.

Por último, las terapias anti-CTC para limitar el proceso de metástasis es un campo activo de investigación y que posiblemente depare importantes frutos en futuro no lejano.

7. CONCLUSIONES

“Como las cosas humanas no son eternas, y van siempre en declive desde sus principios hasta llegar a su último fin, especialmente las vidas de los hombres..., llegó su fin y acabamiento...”

Miguel de Cervantes Saavedra

Capítulo LXXIV. De cómo Don Quijote cayó malo y del testamento que hizo y su muerte. Don Quijote de la Mancha.

- IsoFlux™ es más eficiente que CellSearch® en el aislamiento de CTC en pacientes con CCRm QT-naïve para la enfermedad avanzada.
- CTC ≥ 3 fue el mejor punto de corte para predecir la supervivencia con CellSearch® en pacientes con cáncer colorrectal metastásico vírgenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada, coincidiendo con lo ya publicado por otros autores.
- CTC ≥ 11 fue el mejor punto de corte para predecir la supervivencia con IsoFlux™ en pacientes con cáncer colorrectal metastásico vírgenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada, proponiéndose su validación en un estudio con mayor tamaño muestral.
- IsoFlux™ permite la detección y enumeración de CTC en pacientes con cáncer de cabeza y cuello tanto de histología epidermoide como no epidermoide.
- IsoFlux™ consiguió en una mayoría de casos, la cantidad mínima establecida de CTC para realizar análisis genómicos de alta sensibilidad.
- castPCR™ es más sensible que tecnologías de RT-PCR (cobas® y TheraScreen®) o de mPCR (CLART multiplex PCR) como método de análisis mutacional de KRAS en CTC recuperadas con IsoFlux™ en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
- La caracterización de KRAS y NRAS mediante tecnología BEAMing en ADN de CTC recuperadas con IsoFlux™ es viable en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
- IsoFlux™ permite la recuperación de CTC para su caracterización molecular mediante PCR digital y secuenciación masiva (NGS) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.
- El análisis mutacional del plasma y las CTC recuperadas con IsoFlux™ en pacientes con cáncer colorrectal y con cáncer de cabeza y cuello es, con frecuencia, discordante, pudiendo indicar un origen biológico diferente de estas dos modalidades de biopsia líquida.
- El análisis mutacional de las CTC es capaz de reflejar la heterogeneidad del tumor primario, con la ventaja de evitar el sesgo espacial y temporal de la biopsia tradicional.
- En conjunto, estos resultados indican que las CTC aisladas con IsoFlux® podrían ser un marcador pronóstico útil, a confirmar en un estudio mayor, así como una

poderosa y versátil herramienta de predicción al permitir su caracterización molecular mediante técnicas de análisis mutacional de alta sensibilidad.

8. BIBLIOGRAFÍA

“Supo entonces que era capaz de comprender el inglés escrito, y que entre pergamino y pergamino había leído de la primera página a la última, como si fuera una novela...”

Gabriel García Márquez

Cien años de soledad

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019: {Cancer} {Statistics}, 2019. CA Cancer J Clin [Internet]. 2019;69(1):7–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres [Internet]. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020. Available from: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf
3. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. Lancet (London, England) [Internet]. 2019;6736(19):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31492501>
4. Antman EM, Loscalzo J. Precision medicine in cardiology. Nat Rev Cardiol. 2016;13(June):591–602.
5. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. Cancer Discov. 2016;6(5):479–91.
6. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. Mol Oncol. 2016;10(3):374–94.
7. Vries R De, Muller M, Noort V Van Der, Theelen WSME, Schouten RD, Hummelink K. Prediction of response to anti-PD-1 therapy in patients with non-small-cell lung cancer by electronic nose analysis of exhaled breath. Ann Oncol. 2019;30(10):1660–6.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
9. Lui RN, Tsoi KKF, Ho JMW, Lo CM, Chan FCH, Kyaw MH, et al. Global Increasing Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer Across 5 Continents: A Joinpoint Regression Analysis of 1,922,167 Cases. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2019;28(8):1275–82.
10. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 (US statistics). CA Cancer J

- Clin [Internet]. 2019;69(1):7–34. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>
11. Weinberg BA, Marshall JL SM. The growing challenge of young adults with colorectal cancer. *Oncol (willinst Park)*. 2017;(31):381–9.
 12. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. Vitamin D status and ill health: A systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(1):76–89.
 13. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: A large European cohort study. *BMC Med*. 2014;12(1).
 14. Kohler LN, Garcia DO, Harris RB, Oren E, Roe DJ, Jacobs ET. Adherence to diet and physical activity cancer prevention guidelines and cancer outcomes: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(7):1018–28.
 15. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-dose aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drug use and colorectal cancer risk: A population-based, case-control study. *Ann Intern Med*. 2015;163(5):347–55.
 16. Hemminki K, Chen B. Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(7):1253–6.
 17. Lung MS, Trainer AH, Campbell I, Lipton L. Familial colorectal cancer. *Intern Med J*. 2015;45(5):482–91.
 18. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
 19. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (80-)*. 2017;357(6349):409–13.
 20. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2018;(38):231–8.
 21. Van Cutsem E, Cuyle PJ, Yaeger R et al. BEACON CRC study safety lead-in (SLI) in patients with BRAFV600E metastatic colorectal cancer (mCRC): efficacy and tumor markers. Presented at: American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; San Francisco, CA; March 2018. 2018;

22. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016;17(6):738–46. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00150-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00150-9)
23. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, Hurwitz H, Spigel DR, Sweeney C, et al. Targeted therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: Results from mypathway, an open-label, phase IIA multiple basket study. *J Clin Oncol*. 2018;36(6):536–42.
24. Raghav K, Morris V, Tang C, Morelli P, Amin HM, Chen K, et al. MET amplification in metastatic colorectal cancer: An acquired response to EGFR inhibition, not a de novo phenomenon. *Oncotarget*. 2016;7(34):54627–31.
25. Amatu A, Somaschini A, Cerea G, Bosotti R, Valtorta E, Buonandi P, et al. Novel CAD-ALK gene rearrangement is drugable by entrectinib in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;113(12):1730–4.
26. Drilon A, Siena S, Ou SHI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and antitumor activity of the multitargeted pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: Combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov*. 2017;7(4):400–9.
27. NCCN Guidelines Version 2.2019 Colon Cancer. *Natl Compr Cancer Netw*. 2019;
28. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of familial risk-colorectal cancer: European Society for medical oncology clinical practice guidelines. *J Clin Oncol*. 2015;33(2):209–17.
29. Lenz H-J, Ou F-S, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2019;37(22):1876–85.
30. Amin MB, Edge SB GF. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. New York: Springer International Publishing. 2017;

31. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Miyoshi M, Kajiwarra Y, et al. Extramural cancer deposits without nodal structure in colorectal cancer: Optimal categorization for prognostic staging. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(2):287–94.
32. Kniijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal ID. Perineural invasion is a strong prognostic factor in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):103–12.
33. Version 2.2020 Colorectal cancer screening. Natl Compr Cancer Netw [Internet]. 2020;1–63. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colorectal_screening.pdf
34. Seitz U, Bohnacker S, Seewald S, Thonke F, Brand B, Bräutigam T, et al. Is endoscopic polypectomy an adequate therapy for malignant colorectal adenomas? Presentation of 114 patients and review of the literature. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(11):1789–97.
35. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8706–12.
36. Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: Results of the PETACC-3 trial. *Ann Oncol*. 2015;26(1):126–32.
37. Kannarkatt J, Joseph J, Kurniali PC, Al-Janadi A, Hrinczenko B. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer: A Clinical Dilemma. *J Oncol Pract*. 2017;13(4):233–41.
38. André T, Vernerey D, Mineur L, Bennouna J, Desrame J, Faroux R, et al. Three versus 6 months of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer: Disease-free survival results from a randomized, open-label, International Duration Evaluation of Adjuvant (IDEA) France, phase III trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(15):1469–77.
39. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1177–88.

40. NCCN Guidelines Version 3.2019 Rectal Cancer. Natl Compr Cancer Netw. 2019;
41. Clancy C, Burke JP, Albert MR, O'Connell PR, Winter DC. Transanal endoscopic microsurgery versus standard transanal excision for the removal of rectal neoplasms: A systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2015;58(2):254–61.
42. Aubert M, Mege D, Panis Y. Total mesorectal excision for low and middle rectal cancer: laparoscopic versus transanal approach—a meta-analysis. *Surg Endosc* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00464-019-07160-8>
43. Marr R, Birbeck K, Garvican J, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons WJ, et al. The modern abdominoperineal excision: The next challenge after total mesorectal excision. *Ann Surg*. 2005;242(1):74–82.
44. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: A randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):579–88.
45. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *J Clin Oncol*. 2012;30(31):3827–33.
46. Lefevre JH, Mineur L, Kotti S, Rullier E, Rouanet P, De Chaisemartin C, et al. Effect of interval (7 or 11 weeks) between neoadjuvant radiochemotherapy and surgery on complete pathologic response in rectal cancer: A multicenter, randomized, controlled trial (GRECCAR-6). *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3773–80.
47. Park IJ, You YN, Agarwal A, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Eng C, et al. Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1770–6.
48. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: Updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(15):1554–62.

49. Hong YS, Nam BH, Kim K pyo, Kim JE, Park SJ, Park YS, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin as adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): An open-label, multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1245–53.
50. Sastre J, Serrano JJ, Fernández C, Ramirez C, Ortega L, García-Paredes B, et al. Risk-adapted adjuvant chemotherapy after concomitant fluoropyrimidine-radiotherapy neoadjuvant treatment for patients with resectable CT3-4 or N+ rectal cancer: Five-year disease-free survival results of a single-center series. *Clin Colorectal Cancer* [Internet]. 2016;15(2):128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2015.08.001>
51. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne CH, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer.* 2006;42(14):2212–21.
52. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229–37.
53. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):2006–12.
54. Yamazaki K, Nagase M, Tamagawa H, Ueda S, Tamura T, Murata K, et al. Randomized phase III study of bevacizumab plus FOLFIRI and bevacizumab plus mFOLFOX6 as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (WJOG4407G). *Ann Oncol.* 2016;27(8):1539–46.
55. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: Updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1306–15.
56. Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, Rossini D, Pietrantonio F et al. Updated results of TRIBE2, a phase III, randomized strategy study by GONO in the first-

- and second-line treatment of unresectable mCRC. *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl (May 20, 2019)):3508–3508.
57. Sastre J, Vieitez JM, Gomez-España MA, Gil Calle S, Salud Salvia A, Graña Suárez B et al. Randomized phase III study comparing FOLFOX + bevacizumab versus folfoxiri + bevacizumab (BEV) as 1st line treatment in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with ≥ 3 baseline circulating tumor cells (bCTCs). *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl (May 20, 2019)):3507-3507.
58. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1077–85.
59. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2011–9.
60. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol*. 2015;26(1):13–21.
61. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023–34.
62. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, Lenz HJ, Heinemann V, Klinkhardt U, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015;51(10):1243–52.
63. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692–700.
64. Raghav KPS, Overman MJ, Yu R et al. HER2 amplification as a negative predictive biomarker for anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34:3517–3517.
65. Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, Bergamo F, Cortesi E, Tomasello G, et al.

- Primary tumor sidedness and benefit from FOLFOXIRI plus bevacizumab as initial therapy for metastatic colorectal cancer. Retrospective analysis of the TRIBE trial by GONO. *Ann Oncol*. 2018;29(7):1528–34.
66. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3).
67. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer* [Internet]. 2017;70:87–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.007>
68. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with ras wild-type metastatic colorectal cancer retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):194–201.
69. Alan P. Venook, Donna Niedzwiecki, Federico Innocenti et al. Impact of primary (1º) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2016;34(15):suppl (May 20) 3504-3504.
70. Boeckx N, Koukakis R, de Beeck KO, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, et al. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: Results from two randomized first-line panitumumab studies. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1862–8.
71. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI ± panitumumab for second-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(1):107–16.
72. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Ann Oncol*. 2011;22(7):1535–46.
73. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch

- repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773–9.
74. Simkens LHJ, Van Tinteren H, May A, Ten Tije AJ, Creemers GJM, Loosveld OJL, et al. Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (CAIRO3): A phase 3 randomised controlled trial of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Lancet*. 2015;385(9980):1843–52.
75. Hegewisch-Becker S, Graeven U, Lerchenmüller CA, Killing B, Depenbusch R, Steffens CC, et al. Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): A randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1355–69.
76. Aparicio T, Ghiringhelli F, Boige V, Le Malicot K, Taieb J, Bouche O, et al. Bevacizumab maintenance versus no maintenance during chemotherapy-free intervals in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III trial (PRODIGE 9). *J Clin Oncol*. 2018;36(7):674–81.
77. Aranda E, García-Alfonso P, Benavides M, Sánchez Ruiz A, Guillén-Ponce C, Safont MJ, et al. First-line mFOLFOX plus cetuximab followed by mFOLFOX plus cetuximab or single-agent cetuximab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: Phase II randomised MACRO2 TTD study. *Eur J Cancer*. 2018;101:263–72.
78. Choti MA, Sitzmann J V., Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsin R, Schulick RD, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg*. 2002;235(6):759–66.
79. Wiegering A, Riegel J, Wagner J, Kunzmann V, Baur J, Walles T, et al. The impact of pulmonary metastasectomy in patients with previously resected colorectal cancer liver metastases. *PLoS One*. 2017;12(3):1–13.
80. Pawlik TM, Schulick RD, Choti MA. Expanding Criteria for Resectability of Colorectal Liver Metastases. *Oncologist*. 2008;13(1):51–64.
81. Hur H, Ko YT, Min BS, Kim KS, Choi JS, Sohn SK, et al. Comparative study of resection and radiofrequency ablation in the treatment of solitary colorectal liver metastases. *Am J Surg*. 2009;197(6):728–36.
82. Araujo RLC, Gönen M, Herman P. Chemotherapy for Patients with Colorectal

- Liver Metastases Who Underwent Curative Resection Improves Long-Term Outcomes: Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(9):3070–8.
83. Khoo E, O'Neill S, Brown E, Wigmore SJ, Harrison EM. Systematic review of systemic adjuvant, neoadjuvant and perioperative chemotherapy for resectable colorectal-liver metastases. *Hpb [Internet]*. 2016;18(6):485–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpb.2016.03.001>
84. Cui CH, Huang SX, Qi J, Zhu HJ, Huang ZH, Yu JL. Neoadjuvant chemotherapy (NCT) plus targeted agents versus NCT alone in colorectal liver metastases patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2015;6(41):44005–18.
85. Zhao J, van Mierlo KMC, Gómez-Ramírez J, Kim H, Pilgrim CHC, Pessaux P, et al. Systematic review of the influence of chemotherapy-associated liver injury on outcome after partial hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2017;104(8):990–1002.
86. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein W, Raab HR, Weitz J, Lordick F, et al. Survival of patients with initially unresectable colorectal liver metastases treated with FOLFOX/cetuximab or FOLFIRI/cetuximab in a multidisciplinary concept (CELIM study). *Ann Oncol*. 2014;25(5):1018–25.
87. Ye LC, Liu TS, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Zai SY, et al. Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. *J Clin Oncol*. 2013;31(16):1931–8.
88. Lam VWT, Laurence JM, Pang T, Johnston E, Hollands MJ, Pleass HCC, et al. A systematic review of a liver-first approach in patients with colorectal cancer and synchronous colorectal liver metastases. *Hpb*. 2014;16(2):101–8.
89. Johnston FM, Mavros MN, Herman JM, Pawlik TM. Local therapies for hepatic metastases. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2013;11(2):153–60.
90. Agolli L, Bracci S, Nicosia L, Valeriani M, De Sanctis V, Osti MF. Lung Metastases Treated With Stereotactic Ablative Radiation Therapy in Oligometastatic Colorectal Cancer Patients: Outcomes and Prognostic Factors After Long-Term Follow-Up. *Clin Colorectal Cancer [Internet]*. 2017;16(1):58–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.07.004>

91. Kim TW, Elme A, Kusic Z, Park JO, Udrea AA, Kim SY, et al. A phase 3 trial evaluating panitumumab plus best supportive care vs best supportive care in chemorefractory wild-type KRAS or RAS metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(10):1206–14.
92. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): A prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(8):749–59.
93. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: Phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(14):2311–9.
94. Scott Kopetz, Shannon L McDonough, Heinz-Josef Lenz, Anthony Martin Magliocco, Chloe Evelyn Atreya, Luis A. Diaz, Carmen Joseph Allegra, Kanwal Pratap Singh Raghav, Van Karllye Morris, Stephen E. Wang, Christopher Hanyoung Lieu, Katherine A Guthrie HSH. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol*. 2017;35((suppl; abstr 3505)).
95. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, von Moos R, Viéitez JM, Bouché O, Borg C, Steffens CC, Alonso-Orduña V, Schlichting C, Reyes-Rivera I, Bendahmane B, André T KSMSI. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):29–37.
96. G. Masi, L. Salvatore, L. Boni, F. Loupakis, C. Cremolini, L. Fornaro, M. Schirripa, S. Cupini, C. Barbara, V. Safina, C. Granetto, E. Fea, L. Antonuzzo, C. Boni, G. Allegrini, S. Chiara, D. Amoroso AB& AF on behalf of the BSI. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: Final results of the randomized BEBYP trial. *Ann Oncol*. 2015;26(4):724–30.
97. Cartwright TH, Yim YM, Yu E, Chung H, Halm M, Forsyth M. Survival outcomes of bevacizumab beyond progression in metastatic colorectal cancer patients treated in us community oncology. *Clin Colorectal Cancer*. 2012;11(4):238–46.

98. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3499–506.
99. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):499–508.
100. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9863):303–12.
101. Li J, Qin S, Xu R, Yau TCC, Ma B, Pan H, et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):619–29.
102. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(20):1909–19.
103. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3235–42.
104. Tota JE, Best AF, Zumsteg ZS, Gillison ML, Rosenberg PS, Chaturvedi AK. Evolution of the oropharynx cancer epidemic in the United States: Moderation of increasing incidence in younger individuals and shift in the burden to older individuals. *J Clin Oncol*. 2019;37(18):1538–46.
105. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24–35.
106. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. P16 Protein

- Expression and Human Papillomavirus Status As Prognostic Biomarkers of Nonoropharyngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(35):3930–8.
107. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, et al. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2102–11.
108. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1705–15.
109. Vermorken JB, Remenar E, Van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1695–704.
110. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):269–82.
111. The Cancer Genome Atlas T. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576–82.
112. Dubot C, Bernard V, Sablin MP, Vacher S, Chemlali W, Schnitzler A, et al. Comprehensive genomic profiling of head and neck squamous cell carcinoma reveals FGFR1 amplifications and tumour genomic alterations burden as prognostic biomarkers of survival. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;91:47–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.016>
113. Chung CH, Guthrie VB, Masica DL, Tokheim C, Kang H, Richmon J, et al. Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Ann Oncol*. 2015;26(6):1216–23.
114. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(19):1856–67. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602252>
115. Alexandrov LB, Nik-zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2014;500(7463):415–21.
116. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The

- head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*. 2016;1(17):1–18.
117. Lin DC, Meng X, Hazawa M, Nagata Y, Varela AM, Xu L, et al. The genomic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(8):866–71.
118. Ali SM, Yao M, Yao J, Wang J, Cheng Y, Schrock AB, et al. Comprehensive genomic profiling of different subtypes of nasopharyngeal carcinoma reveals similarities and differences to guide targeted therapy. *Cancer*. 2017;123(18):3628–37.
119. Wang X, Luo Y, Li M, Yan H, Sun M. Management of salivary gland carcinomas - a review. 2017;8(3):3946–56.
120. Drilon A, Li G, Dogan S, Gounder M, Shen R, Arcila M, et al. What hides behind the MASC: Clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol*. 2016;27(5):920–6.
121. Yap TA, Plummer R, Azad NS, Helleday T. The DNA Damaging Revolution: PARP Inhibitors and Beyond. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2019;(39):185–95.
122. D’Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, et al. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(6):521–9.
123. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2004;350(19):1937-1944+2019.
124. Trifiletti DM, Smith A, Mitra N, Grover S, Lukens JN, Cohen RB, et al. Beyond positive margins and extracapsular extension: Evaluating the utilization and clinical impact of postoperative chemoradiotherapy in resected locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(14):1550–60.
125. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(19):1945–52.
126. Pignon JP, Maître A le, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and

- 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009;92(1):4–14.
127. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H, Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(1):92–8.
128. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11: A comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):845–52.
129. Rimmer J, Giddings CE, Vaz F, Brooks J HC. Management of vascular complications of head and neck cancer. *J Laryngol Otol.* 2012;126(2):111–5.
130. Hitt R, Grau JJ, López-Pousa A, Berrocal A, García-Girón C, Irigoyen A, et al. A randomized phase III trial comparing induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone as treatment of unresectable head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(1):216–25.
131. Ghi MG, Paccagnella A, Ferrari D, Foa P, Alterio D, Codecá C, et al. Induction TPF followed by concomitant treatment versus concomitant treatment alone in locally advanced head and neck cancer. A phase II-III trial. *Ann Oncol.* 2017;28(9):2206–12.
132. Lefebvre JL, Pointreau Y, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, et al. Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: The TREMPIN randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):853–9.
133. Geoffrois L, Martin L, De Raucourt D et al. Induction chemotherapy followed by cetuximab radiotherapy is not superior to concurrent chemoradiotherapy for head and neck carcinomas: results of the GORTEC 2007-02 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2018;(Jul 17:JCO2017762591).
134. Hitt R, Mesia R, Grau JJ et al. Randomized phase III trial of induction chemotherapy (ICT) with docetaxel-cisplatin-5fluorouracil (DCF) followed by cisplatin-radiotherapy (CRT) or cetuximab-radiotherapy (CetRT) in patients (pts) with locally advanced unresectable head and neck cancer (L. *J Clin Oncol.* 2016;34:(suppl; abstr 6001).

135. NCCN Guidelines Version 3.2019 Head and Neck Cancers. Natl Compr Cancer Netw. 2019;
136. Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2006;354:567–78.
137. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10166):51–60.
138. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised , multicentre , non-inferiority trial. *Lancet*. 2018;6736(18):1–11.
139. Mehanna H, Wong WL, Mcconkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AGJ, et al. PET-CT surveillance versus neck dissection in advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2016;374(15):1444–54.
140. Economopoulou P, Kotsantis I, Psyrri A. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: Combinatorial immunotherapy approaches. *ESMO Open*. 2016;1(6):1–9.
141. Zhang Y, Chen L, Hu G-Q, Zhang N, Zhu X-D, Yang K-Y, et al. Gemcitabine and Cisplatin Induction Chemotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;
142. Seethala RR. Salivary Gland Tumors: Current Concepts and Controversies. *Surg Pathol Clin [Internet]*. 2017;10(1):155–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2016.11.004>
143. Bossi P, Farina D, Gatta G, Lombardi D, Nicolai P, Orlandi E. Paranasal sinus cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;98:45–61.
144. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116–27.
145. Hitt R, Irigoyen A, Cortes-Funes H, Grau JJ, García-Sáenz JA, Cruz-Hernandez JJ. Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the

- first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Ann Oncol*. 2012;23(4):1016–22.
146. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;393(10167):156–67.
147. Danny Rischin, Kevin J. Harrington, Richard Greil, Denis Soulieres, Makoto Tahara, Gilberto de Castro, Amanda Psyrri, Neus Baste, Prakash C. Neupane, Ase Bratland, Thorsten Fuereder, Brett Gordon Maxwell Hughes, Ricard Mesia, Nuttapong Ngamphaiboon, Tamar BB. Protocol-specified final analysis of the phase 3 KEYNOTE-048 trial of pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). *J Clin Oncol*. 2019;no. 15_sup:6000-6000.
148. Joel Guigay, Jerome Fayette, Ricard Mesia, Cedrik Lafond, Esma Saada-Bouزيد, Lionnel Geoffrois, Laurent Martin, Didier Cupissol, Olivier Capitain, Helene Castanie, Damien Vansteene, Philippe Schafhausen, Catherine Dubos Arvis, Caroline Even, Christian Sir AA. TPExtreme randomized trial: TPEx versus Extreme regimen in 1st line recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl (May 20, 2019)):6002–6002.
149. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10212):1915–28.
150. Zhang L, Huang Y, Hong S, Yang Y, Yu G, Jia J, et al. Gemcitabine plus cisplatin versus fluorouracil plus cisplatin in recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10054):1883–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31388-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31388-5)
151. Hsu C, Lee SH, Ejadi S, Even C, Cohen RB, Le Tourneau C, et al. Safety and antitumor activity of pembrolizumab in patients with programmed death-ligand

- 1-positive nasopharyngeal carcinoma: Results of the KEYNOTE-028 study. *J Clin Oncol*. 2017;35(36):4050–6.
152. Fang W, Yang Y, Ma Y, Hong S, Lin L, He X, et al. Camrelizumab (SHR-1210) alone or in combination with gemcitabine plus cisplatin for nasopharyngeal carcinoma: results from two single-arm, phase 1 trials. *Lancet Oncol* [Internet]. 2018;19(10):1338–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30495-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30495-9)
153. E. Boon, M. Bel, W. van Boxtel, W.T.A van der Graaf, R.J.J. van Es SEJ, Eerenstein, R.J. Baatenburg de Jong⁵, M.W.M. van den Brekel LA van der, Velden, M.J.H. Witjes, A. Hoeben, S.M. Willems, E. Bloemena LAS, S.F. Oosting, PALGA group, M.A. Jonker, U.E. Flucke CML van H. A clinicopathological study and prognostic factor analysis of 177 salivary duct carcinoma patients from The Netherlands. *Int J Cancer*. 2018;(143):758–66.
154. Boon E, van Boxtel W, Buter J, Baatenburg de Jong RJ, van Es RJJ, Bel M, et al. Androgen deprivation therapy for androgen receptor-positive advanced salivary duct carcinoma: A nationwide case series of 35 patients in The Netherlands. *Head Neck*. 2018;40(3):605–13.
155. Fushimi C, Tada Y, Takahashi H, Nagao T, Ojiri H, Masubuchi T, et al. A prospective phase II study of combined androgen blockade in patients with androgen receptor-positive metastatic or locally advanced unresectable salivary gland carcinoma. *Ann Oncol*. 2018;29(4):979–84.
156. Gibo T, Sekiguchi N, Gomi D, Noguchi T, Fukushima T, Kobayashi T, et al. Targeted therapy with trastuzumab for epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced salivary duct carcinoma: A case report. *Mol Clin Oncol*. 2019;2:111–5.
157. Park JC, Ma TM, Rooper L, Hembrough T, Foss RD, Schmitt NC, et al. Exceptional responses to pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in human epidermal growth factor receptor-2 high expressing salivary duct carcinomas. *Head Neck*. 2018;40(12):E100–6.
158. Servato JPS, Da Silva SJ, De Faria PR, Cardoso S V., Loyola AM. Small cell carcinoma of the salivary gland: A systematic literature review and two case reports. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(1):89–98.

159. Kidess-Sigal E, Liu HE, Triboulet MM, Che J, Ramani VC, Visser BC, et al. Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(51):85349–64.
160. Morgan C. Observations on cancer: its pathology, and its relations to the organism and to other morbid growths. *Lancet* (London, England). 1874;(103):325–9.
161. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;(14):146–7.
162. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosom Cancer*. 2019;58(4):219–32.
163. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2527–35.
164. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8152–62.
165. Denève E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D, Coffy A, Daurès JP, et al. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem*. 2013;59(9):1384–92.
166. Scher HI, Heller G, Molina A, Attard G, Danila DC, Jia X, et al. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(12):1348–55.
167. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781–91.
168. Martín M, Custodio S, Casas MM, García-Sáenz J, Torre J, Bellón-Cano J, et al. Circulating Tumor Cells Following First Chemotherapy Cycle: An Early and Strong Predictor of Outcome in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Oncologist*. 2013;18(8):917–23.
169. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJB, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AGJ, et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed

- breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(5).
170. Liling Zhang, Sabine Riethdorf, Gang Wu, Tao Wang, Kunyu Yang, Gang Peng, Junli Liu KP. Meta-analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5701–10.
171. Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, Rivera F, Valladares M, Massuti B, et al. Circulating Tumor Cell Count Is a Prognostic Factor in Metastatic Colorectal Cancer Patients Receiving First-Line Chemotherapy Plus Bevacizumab: A Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Study. *Oncologist.* 2012;17(7):947–55.
172. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(7):1223–9.
173. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJM, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol [Internet].* 2009;21(5):1006–12. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp463>
174. Thalgott M, Rack B, Horn T, Heck MM, Eiber M, Kübler H, et al. Detection of circulating tumor cells in locally advanced high-risk prostate cancer during neoadjuvant chemotherapy and radical prostatectomy. *Anticancer Res.* 2015;35(10):5679–86.
175. Rink M, Chun FK, Dahlem R, Soave A, Minner S, Hansen J, et al. Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: A prospective study. *Eur Urol.* 2012;61(4):810–7.
176. Nicolazzo C, Busetto GM, Gradilone A, Sperduti I, del Giudice F, Loreni F, et al. Circulating Tumor Cells Identify Patients with Super-High-Risk Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Updated Outcome Analysis of a Prospective Single-Center Trial. *Oncologist.* 2019;24(5):612–6.
177. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2013;133(9):2165–71.

178. Sánchez-Lorencio MI, Ramirez P, Saenz L, Martínez Sánchez M V., De La Orden V, Mediero-Valeros B, et al. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients with Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2015;47(9):2639–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.10.003>
179. Anthony Lucci, Carolyn S Hall, Ashutosh K Lodhi, Anirban Bhattacharyya, Amber E Anderson, Lianchun Xiao, Isabelle Bedrosian, Henry M Kuerer SK. Circulating Tumour Cells in Non-Metastatic Breast Cancer: A Prospective Study. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):688–95.
180. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud JM, Padovani B, et al. “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with Chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9(10):4–10.
181. Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay. *Transl Oncol*. 2013;6(5):528–38.
182. Ma Y, Luk A, Young FP, Lynch D, Chua W, Balakrishnar B, et al. Droplet digital PCR based androgen receptor variant 7 (AR-V7) detection from prostate cancer patient blood biopsies. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).
183. Kalikaki A, Politaki H, Souglakos J, Apostolaki S, Papadimitraki E, Georgoulia N, et al. KRAS genotypic changes of circulating tumor cells during treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(8).
184. Kong SL, Liu X, Suhaimi N-AM, Koh KJH, Hu M, San Lee DY, et al. Molecular characterization of circulating colorectal tumor cells defines genetic signatures for individualized cancer care. *Oncotarget*. 2017;8(40):68026–37.
185. Kondo Y, Hayashi K, Kawakami K, Miwa Y, Hayashi H, Yamamoto M. KRAS mutation analysis of single circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–10.
186. Bidard F-C, Kiavue N, Ychou M, Cabel L, Stern M-H, Madic J, et al. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Detection in Potentially Resectable Metastatic Colorectal Cancer: A Prospective Ancillary Study to the Unicancer Prodige-14 Trial. *Cells*. 2019;8(6):516.
187. Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, Angelidis I, Zavridou M, Economopoulou

- P, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1923–33.
188. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):252–60.
189. Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-De Vries J, Biermann K, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer*. 2013;133(1):130–41.
190. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1199–209.
191. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406–14.
192. Yang M, Forbes ME, Bitting RL, O'Neill SS, Chou PC, Topaloglu U, et al. Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: Time for a TNMB system? *Ann Oncol*. 2018;29(2):311–23.
193. Lin E, Cao T, Nagrath S, King MR. Circulating Tumor Cells: Diagnostic and Therapeutic Applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2018;20(1):329–52.
194. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017;14(9):531–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
195. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpf M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W TA. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):539–44.
196. Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. Enrichment of rare cancer cells

- through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp Hematol*. 2004;32(10):891–904.
197. Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, Jatana KR, Schuller D, Agrawal A, et al. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(2):521–34.
198. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):329–40.
199. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.
200. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem*. 2012;58(5):936–40.
201. Cauley CE, Pitman MB, Zhou J, Perkins J, Kuleman B, Liss AS, et al. Circulating Epithelial Cells in Patients with Pancreatic Lesions: Clinical and Pathologic Findings. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2015;221(3):699–707. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.014>
202. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJB, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AGJ, et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012;14(5).
203. Galletti G, Sung MS, Vahdat LT, Shah MA, Santana SM, Altavilla G, et al. Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device. *Lab Chip*. 2014;14(1):147–56.
204. Satelli A, Brownlee Z, Mitra A, Meng QH, Li S. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule-and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem*. 2015;61(1):259–66.
205. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, Chanel-Vos C, et al. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific

- microfluidic device. PLoS One. 2012;7(4):1–10.
206. Winer-Jones JP, Vahidi B, Arquilevich N, Fang C, Ferguson S, Harkins D, et al. Circulating tumor cells: Clinically relevant molecular access based on a novel CTC flow cell. PLoS One. 2014;9(1):1–10.
207. IsoFlux™ Enhanced CTC Kit. Available from: <https://static1.squarespace.com/static/573506a001dbaec47dcf0a28/t/57aaa755e58c62f754f3c7d8/1470801754206/IsoFlux+Enhanced+Enrichment+Kit+Specification.pdf>
208. Jose G Moreno, M Craig Miller, Steve Gross, W Jeffrey Allard, Leonard G Gomella LWMMT. Circulating Tumor Cells Predict Survival in Patients With Metastatic Prostate Cancer. Urology. 2005;65(4):713–8.
209. Johann S de Bono, Howard I Scher, R Bruce Montgomery, Christopher Parker, M Craig Miller, Henk Tissing, Gerald V Doyle, Leon W W M Terstappen, Kenneth J Pienta DR. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit From Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(19):6302–9.
210. Sastre J, Vidaurreta M, Gómez A, Rivera F, Massutí B, López MR, et al. Prognostic value of the combination of circulating tumor cells plus kras in patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy plus bevacizumab. Clin Colorectal Cancer [Internet]. 2013;12(4):280–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2013.06.001>
211. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LWMM, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2006;6(2):125–32.
212. Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. Int J Cancer. 2012;130(7):1590–7.
213. Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A, Giannini G, De Falco E, Chimenti I, et al. Circulating tumor cells: Exploring intratumor heterogeneity of colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2014;15(5):496–503.
214. Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, et al. Epithelial-

- mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(11):2526–34.
215. Powell AA, Talasaz AAH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, Deng G, et al. Single cell profiling of Circulating tumor cells: Transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One.* 2012;7(5).
216. Nagrath S, Sequist L V., Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450(7173):1235–9.
217. Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, et al. Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *J Oncol.* 2011;2011.
218. Brychta N, Drosch M, Driemel C, Fischer JC, Neves RP, Esposito I, et al. Isolation of circulating tumor cells from pancreatic cancer by automated filtration. *Oncotarget.* 2017;8(49):86143–56.
219. Brungs D, Lynch D, Luk AWS, Minaei E, Ranson M, Aghmesheh M, et al. Cryopreservation for delayed circulating tumor cell isolation is a valid strategy for prognostic association of circulating tumor cells in gastroesophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2018;24(7):810–8.
220. Lee AW, Lin FX, Wei PL, Jian-Wei G, Chen JK. Binary-blend fibber-based capture assay of circulating tumor cells for clinical diagnosis of colorectal cancer. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2018;16(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0330-1>
221. Vilhav C, Engström C, Naredi P, Novotny A, Bourghardt-Fagman J, Iresjö BM, et al. Fractional uptake of circulating tumor cells into liver-lung compartments during curative resection of periampullary cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(5):6331–8.
222. Montalbo R, Jiménez N, Mila M, Reig O, Victoria I, Prat A, Marin M MB. Cell plasticity associated to taxane-resistance in preclinical cell models and in circulating tumor cells from metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *J Clin Oncol.* 2019;37(7_suppl (March 01, 2019)):238–238.
223. Alva A, Friedlander T, Clark M, Huebner T, Daignault S, Hussain M, et al. Circulating tumor cells as potential biomarkers in bladder cancer. *J Urol.*

- 2015;194(3):790–8.
224. Ionescu-Zanetti C. Somatic mutation detection from liquid biopsies via NGS. *Urol Cancers*. 2014;
225. Po JW, Ma Y, Balakrishna B, Brungs D, Azimi F, De Souza P, et al. Immunomagnetic isolation of circulating melanoma cells and detection of PD-L1 status. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(2):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0211866>
226. Po JW, Roohullah A, Lynch D, DeFazio A, Harrison M, Harnett PR, et al. Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin. *J Circ Biomarkers*. 2018;7:1–10.
227. Agerbæk M, Bang-Christensen SR, Yang MH, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05793-2>
228. Jacob F, Wynne, Leslie A, Modlin, Andrea Fan et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Stereotactic Ablative Radiotherapy. *ASTRO Meet*. 2013;
229. Onstenk W, Sieuwerts AM, Mostert B, Lalmahomed Z, Bolt-de Vries JB, van Galen A, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(37):59058–69.
230. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc*. 2014;9(3):694–710.
231. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(179).
232. Autebert J, Coudert B, Champ J, Saias L, Guneri ET, Lebofsky R, et al. High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: Towards routine mutation detection. *Lab Chip*. 2015;15(9):2090–101.
233. Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard FC, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(33):14524–9.
234. Earhart CM, Hughes CE, Gaster RS, Ooi CC, Wilson RJ, Zhou LY, et al. Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips. *Lab Chip*. 2014;14(1):78–88.
235. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012;41(4):1241–50.
236. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittl A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, et al. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med*. 2011;9:1–8.
237. Wu Y, Deighan CJ, Miller BL, Balasubramanian P, Lustberg MB, Zborowski M, et al. Isolation and analysis of rare cells in the blood of cancer patients using a negative depletion methodology. *Methods*. 2013;64(2):169–82.
238. Harouaka RA, Zhou M Da, Yeh YT, Khan WJ, Das A, Liu X, et al. Flexible micro spring array device for high-throughput enrichment of viable circulating tumor cells. *Clin Chem*. 2014;60(2):323–33.
239. Sollier E, Go DE, Che J, Gossett DR, O’Byrne S, Weaver WM, et al. Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab Chip*. 2014;14(1):63–77.
240. Gossett DR, Tse HTK, Lee SA, Ying Y, Lindgren AG, Yang OO, et al. Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):7630–5.
241. Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):780–3.
242. SH S. Silicone flotation: a simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood. *Cancer*. 1959;12:590–5.
243. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*. 2002;49(4):150–8.
244. He W, Kularatne SA, Kalli KR, Prendergast FG, Amato RJ, Klee GG, et al.

- Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands. *Int J Cancer*. 2008;123(8):1968–73.
245. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, Drovetto N, Clein AC, Varshavskaya P, et al. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–13.
246. SH S. A SIEVE FOR THE ISOLATION OF CANCER CELLS AND OTHER LARGE CELLS FROM THE BLOOD. *Cancer*. 1964;(17):637–42.
247. Chinen LTD, de Carvalho FM, Rocha BMM, Aguiar CM, Abdallah EA, Campanha D, et al. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up. *J Thorac Dis*. 2013;5(5):593–9.
248. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer*. 2011;105(6):847–53.
249. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011;31(2):427–41.
250. Adams DL, Zhu P, Makarova O V., Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC Adv*. 2014;4(9):4334–42.
251. Zhou M Da, Hao S, Williams AJ, Harouaka RA, Schrand B, Rawal S, et al. Separable bilayer microfiltration device for viable label-free enrichment of circulating tumour cells. *Sci Rep*. 2014;4:1–11.
252. Qin X, Park S, Duffy SP, Matthews K, Ang RR, Todenhöfer T, et al. Size and deformability based separation of circulating tumor cells from castrate resistant prostate cancer patients using resettable cell traps. *Lab Chip*. 2015;15(10):2278–86.
253. Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N, Donaldson MC, Zeinali M, Hamza B, et al. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat Methods*. 2015;12(7):685–91.
254. Zhou J, Giridhar PV, Kasper S, Papautsky I. Modulation of aspect ratio for

- complete separation in an inertial microfluidic channel. *Lab Chip*. 2013;13(10):1919–29.
255. Khoo BL, Warkiani ME, Tan DSW, Bhagat AAS, Irwin D, Lau DP, et al. Clinical validation of an ultra high-throughput spiral microfluidics for the detection and enrichment of viable circulating tumor cells. *PLoS One*. 2014;9(7):1–7.
256. Shim S, Stemke-Hale K, Tsimberidou AM, Noshari J, Anderson TE, Gascoyne PRC. Antibody-independent isolation of circulating tumor cells by continuous-flow dielectrophoresis. *Biomicrofluidics*. 2013;7(1).
257. Carpenter EL, Rader JA, Ruden J, Rappaport EF, Hunter KN, Hallberg PL, et al. Dielectrophoretic capture and genetic analysis of single neuroblastoma tumor cells. *Front Oncol*. 2014;4 JUL(July):1–15.
258. Fabbri F, Carloni S, Zoli W, Ulivi P, Gallerani G, Fici P, et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett*. 2013;335(1):225–31.
259. Peeters DJE, De Laere B, Van Den Eynden GG, Van Laere SJ, Rothé F, Ignatiadis M, et al. Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1358–67.
260. Das M, Riess JW, Frankel P, Schwartz E, Bennis R, Hsieh H Ben, et al. ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression-free survival (PFS) in patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer*. 2012;77(2):421–6.
261. Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh H Ben, Liu X, Yang L, et al. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(1):155–63.
262. Hillig T, Horn P, Nygaard AB, Haugaard AS, Nejlund S, Brandslund I, et al. In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biol*. 2015;36(6):4597–601.
263. Shen, Z, Wu, A CX. Current detection technologies of circulating tumor cells.

- Chem Soc Rev. 2017;46(8):2038–56.
264. Galanzha E, Zharov V. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers (Basel)*. 2013;5(4):1691–738.
265. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. Establishment and characterization of a cell line from human Circulating colon cancer cells. *Cancer Res*. 2015;75(5):892–901.
266. Dennis Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Magnus Hjelm N. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999;64(1):218–24.
267. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(2):346–56.
268. Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, Fleischhacker M. An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:135–9.
269. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477–87.
270. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224).
271. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science (80-)*. 2018;359(6378):926–30.
272. Azad AA, Volik S V., Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: Biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(10):2315–24.
273. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov*. 2013;3(9):1020–9.

274. Romanel A, Tandefelt DG, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, et al. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(312):1–9.
275. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* [Internet]. 2012;486(7404):537–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11219>
276. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* [Internet]. 2012;486(7404):532–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11156>
277. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to Anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2014;6(224).
278. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Mol Oncol* [Internet]. 2014;8(6):1084–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.05.003>
279. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden M V, Consortium C. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. 2020;xxx(xxx).
280. Little S. Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001;7(1):1–12.
281. Reid AL, Freeman JB, Millward M, Ziman M, Gray ES. Detection of BRAF-V600E and V600K in melanoma circulating tumour cells by droplet digital PCR. *Clin Biochem* [Internet]. 2015;48(15):999–1002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.007>
282. Life Technologies. Accurate and sensitive somatic mutation detection powered by castPCR technology. *Prod Bull Appl Biosyst*. 2014;
283. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer:

- A retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):937–48.
284. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, Blair B, Slater S, Powers P, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3462–9.
285. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):1–11.
286. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9530–5.
287. Ozawa M, Jucoski TS, Vieira E, Carvalho TM, Malheiros D, Maria E, et al. Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free microRNAs as biomarkers. *Transl Res [Internet].* 2020;pii: S1931-5244(20)30065-7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.002>
288. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015;523(7559):177–82.
289. Muller L, Mitsuhashi M, Simms P, Gooding WE, Whiteside TL. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep [Internet].* 2016;6(April 2015):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20254>
290. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch O, et al. Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014;289(7):3869–75.
291. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014;24(6):766–9.
292. Rodríguez M, Silva J, Herrera A, Herrera M, Peña C, Martín P, et al. Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(38):40575–87.
293. García-Romero N, Carrión-Navarro J, Esteban-Rubio S, Lázaro-Ibáñez E, Peris-

- Celda M, Alonso MM, et al. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget*. 2017;8(1):1416–28.
294. Miller MC, Doyle G V., Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:1–8.
295. Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, Veganzones S, Viéitez JM, Alonso V, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(3):535–41.
296. Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Takuwa T, Kuroda A, Matsumoto S, et al. The clinical value of circulating tumour cells (CTCs) in patients undergoing pulmonary metastasectomy for metastatic colorectal cancer. *J Thorac Dis*. 2018;10(3):1569–77.
297. Le UT, Bronsert P, Picardo F, Riethdorf S, Haager B, Rylski B, et al. Intraoperative detection of circulating tumor cells in pulmonary venous blood during metastasectomy for colorectal lung metastases. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–7.
298. Zhao J-X, Liu L-R, Yang X-Y, Liu F, Zhang Z-G. Serum CA19-9 as a marker of circulating tumor cells in first reflux blood of colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(40):67918–32.
299. Wu W, Zhang Z, Gao XH, Shen Z, Jing Y, Lu H, et al. Clinical significance of detecting circulating tumor cells in colorectal cancer using subtraction enrichment and immunostainingfluorescence in situ hybridization (SE-iFISH). *Oncotarget*. 2017;8(13):21639–49.
300. Seeberg LT, Brunborg C, Waage A, Hugenschmidt H, Renolen A, Stav I, et al. Survival Impact of Primary Tumor Lymph Node Status and Circulating Tumor Cells in Patients with Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(8):2113–21.
301. Arrazubi V, Mata E, Antelo ML, Tarifa A, Herrera J, Zazpe C, et al. Circulating Tumor Cells in Patients Undergoing Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. Clinical Utility for Long-Term Outcome: A Prospective Trial. *Ann Surg Oncol*. 2019;
302. Liu Y, Meucci S, Sheng L, Keilholz U. Meta-analysis of the mutational status of

- circulation tumor cells and paired primary tumor tissues from colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(44):77928–41.
303. Matikas A, Voutsina A, Lagoudaki E, Hatzidaki D, Trypaki M, Stoupis G, et al. Detection of KRAS Exon 2 Mutations in Circulating Tumor Cells Isolated by the ISET System from Patients with RAS Wild Type Metastatic Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2017;10(4):693–8.
304. Das A, Kunkel M, Joudeh J, Dicker DT, Scicchitano A, Allen JE, et al. Clinico-pathological correlation of serial measurement of circulating tumor cells in 24 metastatic colorectal cancer patients receiving chemotherapy reveals interpatient heterogeneity correlated with CEA levels but independent of KRAS and BRAF mutation. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(5):709–13.
305. Mohamed Suhaimi NA, Foong YM, Lee DYS, Phyo WM, Cima I, Lee EXW, et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol Oncol*. 2015;9(4):850–60.
306. Shigeyasu, K, Tazawa, H, Hashimoto, Y et al. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut*. 2015;64(4):627–35.
307. Steinert G, Schölch S, Niemietz T, Iwata N, García SA, Behrens B, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2014;74(6):1694–704.
308. Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res*. 2013;73(10):2965–75.
309. Yen LC, Yeh YS, Chen CW, Wang HM, Tsai HL, Lu CY, et al. Detection of KRAS oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4508–13.
310. Nicolazzo C, Raimondi C, Francescangeli F, Ceccarelli S, Trenta P, Magri V, et al. EpCAM-expressing circulating tumor cells in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 2017;32(4):e415–20.
311. Nicolazzo C, Raimondi C, Gradilone A, Emiliani A, Zeuner A, Francescangeli F, et al. Circulating Tumor Cells in Right- and Left-Sided Colorectal Cancer. *Cancers*

- (Basel). 2019;11(8):1042.
312. Ribeiro-Samy S, Oliveira MI, Pereira-Veiga T, Muínelo-Romay L, Carvalho S, Gaspar J, et al. Fast and efficient microfluidic cell filter for isolation of circulating tumor cells from unprocessed whole blood of colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
313. Dizdar L, Fluegen G, van Dalum G, Honisch E, Neves RP, Niederacher D, et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study. *Mol Oncol*. 2019;13(7):1548–58.
314. Rahbari NN, Schölch S, Bork U, Kahlert C, Schneider M, Rahbari M, et al. Prognostic value of circulating endothelial cells in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):37491–501.
315. Gorges TM, Stein A, Quidde J, Hauch S, Röck K, Riethdorf S, et al. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(5):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155126>
316. Garcia J, Forestier J, Dusserre E, Wozny AS, Geiguer F, Merle P, et al. Cross-platform comparison for the detection of RAS mutations in cfDNA (ddPCR Biorad detection assay, BEAMing assay, and NGS strategy). *Oncotarget*. 2018;9(30):21122–31.
317. Normanno N, Esposito Abate R, Lambiase M, Forgione L, Cardone C, Iannaccone A, et al. RAS testing of liquid biopsy correlates with the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2018;29(1):112–8.
318. Schmiegel W, Scott RJ, Dooley S, Lewis W, Meldrum CJ, Pockney P, et al. Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol Oncol*. 2017;11(2):208–19.
319. Vidal J, Muínelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1325–32.

320. Bando H, Kagawa Y, Kato T, Akagi K, Denda T, Nishina T, et al. A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2019;120(10):982–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0457-y>
321. García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2018;119(12):1464–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-018-0293-5>
322. Vivancos A, Aranda E, Benavides M, Élez E, Gómez-España MA, Toledano M, et al. Comparison of the Clinical Sensitivity of the Idylla Platform and the OncoBEAM RAS CRC Assay for KRAS Mutation Detection in Liquid Biopsy Samples. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–8.
323. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol*. 2015;26(4):731–6.
324. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: The AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1211–9.
325. Scalfani F, Chau I, Cunningham D, Hahne JC, Vlachogiannis G, Eltahir Z, et al. KRAS and BRAF mutations in circulating tumour DNA from locally advanced rectal cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19212-5>
326. Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, Raoul JL, Guimbaud R, Pezet D, et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol*. 2017;28(9):2149–59.
327. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal

- cancer patients. *Nat Med*. 2015;21(7):795–801.
328. Siena S, Sartore-Bianchi A, Garcia-Carbonero R, Karthaus M, Smith D, Tabernero J, et al. Dynamic molecular analysis and clinical correlates of tumor evolution within a phase II trial of panitumumab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 2018;29(1):119–26. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx504>
329. Onidani K, Shoji H, Kakizaki T, Yoshimoto S, Okaya S, Miura N, et al. Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA . *Cancer Sci*. 2019;(May):2590–9.
330. Nakamura Y, Yoshino T. Clinical Utility of Analyzing Circulating Tumor DNA in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2018;23(11):1310–8.
331. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* (80-). 2011;333(6046):1157–60.
332. Cancer Genome Atlas Network MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* [Internet]. 2015 Jan 29 [cited 2018 Mar 25];517(7536):576–82. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature14129>
333. Whiteside TL. Head and neck carcinoma immunotherapy: Facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(1):6–13.
334. Theodoraki MN, Yerneni S, Gooding WE, Ohr J, Clump DA, Bauman JE, et al. Circulating exosomes measure responses to therapy in head and neck cancer patients treated with cetuximab, ipilimumab, and IMRT. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):1–9.
335. J C Lin, C S Tsai, W Y Wang et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Venous Blood of Nasopharyngeal Carcinoma Patients by Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Kaoshiung J Med Sci*. 2000;16((1)):1–8.
336. Nakashima H, Yoshida R, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, et al. Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study. *Tumor Biol*. 2019;41(3):1–10.

337. Zhang G, Zong J, Lin S, Verhoeven RJA, Tong S, Chen Y, et al. Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E301–12.
338. Ramayanti O, Verkuijden SAWM, Novianti P, Scheepbouwer C, Misovic B, Koppers-Lalic D, et al. Vesicle-bound EBV-BART13-3p miRNA in circulation distinguishes nasopharyngeal from other head and neck cancer and asymptomatic EBV-infections. *Int J Cancer*. 2019;144(10):2555–66.
339. Wirtschafter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ. Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: A preliminary report. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2002;128(1):40–3.
340. Partridge M, Brakenhoff R, Phillips E, Ali K, Francis R, Hooper R, et al. Detection of Rare Disseminated Tumor Cells Identifies Head and Neck Cancer Patients at Risk of Treatment Failure. *Clin Cancer Res*. 2003;9(14):5287–94.
341. Guney, K, Yoldas, B, Ozbilim, G, Derin, AT, Sarihan, S, Balkan E. Detection of micrometastatic tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. A possible predictor of recurrences? *Saudi Med J*. 2007;28(2):216–20.
342. Winter SC, Stephenson SA, Subramaniam SK, Paleri V, Ha K, Marnane C, et al. Long term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:1–15.
343. Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, Yang L, Jatana CA, White E, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: Initial results. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2010;136(12):1274–9.
344. Buglione M, Grisanti S, Almici C, Mangoni M, Polli C, Consoli F, et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: Preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer* [Internet]. 2012;48(16):3019–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.007>
345. Nichols, AC, Lowes, LE, Szeto, CC, Basmaji, J, Dhaliwal, S, Chapeskie, C, Todorovic, B, Read, N, Venkatesan, V, Hammond, A, Palma, DA, Winkquist, E, Ernst, S, Fung, K, Franklin, JH, Yoo, J, Koropatnick, J, Mymryk, JS; Barrett, JW,

- Allan A. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck*. 2012;34(10):1440–4.
346. Bozec A, Ilie M, Dassonville O, Long E, Poissonnet G, Santini J, et al. Significance of circulating tumor cell detection using the CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2013;270(10):2745–9.
347. He S, Li P, He S, Long T, Zhang N, Fang J, et al. Detection of circulating tumour cells with the CellSearch system in patients with advanced-stage head and neck cancer: Preliminary results. *J Laryngol Otol*. 2013;127(8):788–93.
348. Hsieh, JC, Lin, HC, Huang, CY, Hsu, HL, Wu, TM, Lee, CL, Chen, MC, Wang, HM, Tseng C. Prognostic value of circulating tumor cells with podoplanin expression in patients with locally advanced or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015;37(10):1448–55.
349. Hristozova T, Konschak R, Stromberger C, Fusi A, Liu Z, Weichert W, et al. The presence of circulating tumor cells (CTCs) correlates with lymph node metastasis in nonresectable squamous cell carcinoma of the head and neck region (SCCHN). *Ann Oncol*. 2011;22(8):1878–85.
350. Tinhofer I, Konschak R, Stromberger C, Raguse JD, Dreyer JH, Jöhrens K, et al. Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 2014;25(10):2042–7.
351. Grisanti S, Almici C, Consoli F, Buglione M, Verardi R, Bolzoni-Villaret A, et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: Prognostic and predictive significance. *PLoS One*. 2014;9(8):1–9.
352. Inhestern J, Oertel K, Stemmann V, Schmalenberg H, Dietz A, Rotter N, et al. Prognostic role of circulating tumor cells during induction chemotherapy followed by curative surgery combined with postoperative radiotherapy in patients with locally advanced oral and oropharyngeal squamous cell cancer. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(7):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132901>
353. Kusukawa J, Suefuji Y, Ryu F, Noguchi R, Iwamoto O, Kameyama T. Dissemination of cancer cells into circulation occurs by incisional biopsy of oral

- squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(7):303–7.
354. Garrel R, Mazel M, Perriard F, Vinches M, Cayrefourcq L, Guigay J, et al. Circulating Tumor Cells as a Prognostic Factor in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: the CIRCUTEC Prospective Study. *Clin Chem*. 2019;000:clinchem.2019.305904.
355. Chikamatsu K, Tada H, Takahashi H, Kuwabara-Yokobori Y, Ishii H, Ida S, et al. Expression of immune-regulatory molecules in circulating tumor cells derived from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2019;89(November 2018):34–9.
356. Kulasinghe A, Perry C, Kenny L, Warkiani ME, Nelson C, Punyadeera C. PD-L1 expressing circulating tumour cells in head and neck cancers. *BMC Cancer*. 2017;17(1):4–9.
357. Kulasinghe A, Kenny L, Perry C, Thiery JP, Jovanovic L, Vela I, et al. Impact of label-free technologies in head and neck cancer circulating tumour cells. *Oncotarget*. 2016;7(44):71223–34.
358. Liao C-J, Hsieh C-H, Hung F-C, Wang H-M, Chou W-P, Wu M-H. The Integration of a Three-Dimensional Spheroid Cell Culture Operation in a Circulating Tumor Cell (CTC) Isolation and Purification Process: A Preliminary Study of the Clinical Significance and Prognostic Role of the CTCs Isolated from the Blood Samples o. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):783.
359. Zheng, W, Zhang, Y, Guo, L, Wang, S, Fang, M, Mao, W, Lou J. Evaluation of therapeutic efficacy with CytoSorter® circulating tumor cell-capture system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019;(11):5857–69.
360. Chang PH, Wu MH, Liu SY, Wang HM, Huang WK, Liao CT, et al. The prognostic roles of pretreatment circulating tumor cells, circulating cancer stem-like cells, and programmed cell death-1 expression on peripheral lymphocytes in patients with initially unresectable, recurrent or metastatic head and neck cancer: An ex. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
361. Wang HM, Wu MH, Chang PH, Lin HC, Liao C Da, Wu SM, et al. The change in circulating tumor cells before and during concurrent chemoradiotherapy is associated with survival in patients with locally advanced head and neck cancer.

- Head Neck. 2019;41(8):2676–87.
362. Kawada T, Takahashi H, Sakakura K, Ida S, Mito I, Toyoda M, et al. Circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Feasibility of detection and quantitation. *Head Neck*. 2017;39(11):2180–6.
363. Morgan TM, Wang X, Qian X, Switchenko JM, Nie S, Patel KR, et al. Measurement of circulating tumor cells in squamous cell carcinoma of the head and neck and patient outcomes. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(3):342–7.
364. Sun, T, Zou, K, Yuan, Z, Yang, C, Lin, X, Xiong B. Clinicopathological and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with esophageal cancer: A meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2017;10:3907–16.
365. Ng SP, Bahig H, Wang J, Cardenas CE, Lucci A, Hall CS, et al. Predicting treatment Response based on Dual assessment of magnetic resonance Imaging kinetics and Circulating Tumor cells in patients with Head and Neck cancer (PREDICT-HN): Matching “liquid biopsy” and quantitative tumor modeling. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–8.
366. Zhang J, Shi H, Jiang T, Liu Z, Lin PP, Chen N. Circulating tumor cells with karyotyping as a novel biomarker for diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–12.
367. Si Y, Lan G, Deng Z, Wang Y, Lu Y, Qin Y, et al. Distribution and clinical significance of circulating tumor cells in nasopharyngeal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2016;46(7):622–30.
368. You R, Liu YP, Lin M, Huang PY, Tang LQ, Zhang YN, et al. Relationship of circulating tumor cells and Epstein–Barr virus DNA to progression-free survival and overall survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2019;145(10):2873–83.
369. Li YJ, Luo Y, Xie XQ, Li P, Wang F. The prognostic value of COX-2 expression on circulating tumor cells in nasopharyngeal carcinoma: A prospective analysis. *Radiother Oncol* [Internet]. 2018;129(2):396–402. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.07.022>
370. Vo JH, Nei WL, Hu M, Phyo WM, Wang F, Fong KW, et al. Comparison of Circulating Tumour Cells and Circulating Cell-Free Epstein-Barr Virus DNA in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma Undergoing Radiotherapy. *Sci Rep*.

- 2016;6(1):1–9.
371. He C, Huang X, Su X, Tang T, Zhang X, Ma J, et al. The association between circulating tumor cells and Epstein-Barr virus activation in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2017;18(11):888–94.
372. Fu X, Shen C, Wang H, Chen F, Li G, Wen Z. Joint quantitative measurement of hTERT mRNA in both peripheral blood and circulating tumor cells of patients with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *BMC Cancer*. 2017;17(1):4–11.
373. Ou G, Xing S, Li J, Zhang L, Chen S. Circulating tumor cells: A valuable marker of poor prognosis for advanced nasopharyngeal carcinoma. *Mol Med*. 2019;25(1):1–7.
374. Gröbe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schön G, Wikner J, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):425–33.
375. Sun L, Wang Y, Shi J, Zhu W, Wang X. Association of Plasma Epstein-Barr Virus LMP1 and EBER1 with Circulating Tumor Cells and the Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2019;
376. Wen Z, Li Z, Yong P, Liang D, Xie D, Chen H, et al. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2537–47.
377. Xie X, Luo Y, Ma XL, Li S, Liu L, Zhang H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells and their expression of cyclooxygenase-2 in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(16):6951–61.
378. Lin LH, Chang KW, Kao SY, Cheng HW, Liu CJ. Increased plasma circulating cell-free DNA could be a potential marker for oral cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3303.
379. Perdomo S, Avogbe PH, Foll M, Abedi-Ardekani B, Facciolla VL, Anantharaman D, et al. Circulating tumor DNA detection in head and neck cancer: evaluation of two different detection approaches. *Oncotarget*. 2017;8(42):72621–32.
380. van Ginkel JH, Huibers MMH, van Es RJJ, de Bree R, Willems SM. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head

- and neck cancer patients. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–8.
381. Egyud M, Sridhar P, Devaiah A, Yamada E, Saunders S, Ståhlberg A, et al. Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck*. 2019;41(5):1351–8.
382. Fostira F, Oikonomopoulou P KA. BLOOD-BASED TESTING OF MUTATIONS IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA (HNSCC) USING HIGHLY SENSITIVE SAFESEQ TECHNOLOGY. *Ann Oncol*. 2019;30((suppl_5)):v449-474.
383. Damerla RR, Lee NY, You D, Soni R, Shah R, Reyngold M, et al. Detection of Early Human Papillomavirus–Associated Cancers by Liquid Biopsy. *JCO Precis Oncol*. 2019;(3):1–17.
384. Bhishamjit S Chera , Sunil Kumar, Brian T Beaty et al. Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA During Chemoradiotherapy Correlates With Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4682–90.
385. Dahlstrom KR, Li G, Hussey CS, Vo JT, Wei Q, Zhao C, et al. Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*. 2015;121(19):3455–64.
386. Cao H, Banh A, Kwok S, Shi X, Wu S, Krakow T, et al. Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(3):e351–8.
387. Ahn SM, Chan JYK, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2014;140(9):846–54.
388. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *sci Transl Med*. 2015;7(293):1–8.
389. Mazurek AM, Rutkowski T, Fiszer-Kierzkowska A, Małusecka E, Skłodowski K. Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* [Internet]. 2016;54:36–41. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.12.002>
390. Qiu-Yan Chen, Shao-Yan Guo, Lin-Quan Tang et al. Combination of Tumor Volume and Epstein-Barr Virus DNA Improved Prognostic Stratification of Stage II Nasopharyngeal Carcinoma in the Intensity Modulated Radiotherapy Era: A Large-Scale Cohort Study. *Cancer Res Treat.* 2018;50(3):861–71.
391. Lu Zhang, Lin-Quan Tang, Qiu-Yan Chen et al. Plasma Epstein-Barr Viral DNA Complements TNM Classification of Nasopharyngeal Carcinoma in the Era of Intensity-Modulated Radiotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(5):6221–30.
392. Guo R, Tang LL, Mao YP, Du XJ, Chen L, Zhang ZC, et al. Proposed modifications and incorporation of plasma Epstein-Barr virus DNA improve the TNM staging system for Epstein-Barr virus-related nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2019;125(1):79–89.
393. Lee VHF, Kwong DLW, Leung TW, Choi CW, O’Sullivan B, Lam KO, et al. The addition of pretreatment plasma Epstein–Barr virus DNA into the eighth edition of nasopharyngeal cancer TNM stage classification. *Int J Cancer.* 2019;144(7):1713–22.
394. Xu C, Zhang S, Li WF, Chen L, Mao YP, Guo Y, et al. Selection and Validation of Induction Chemotherapy Beneficiaries Among Patients With T3N0, T3N1, T4N0 Nasopharyngeal Carcinoma Using Epstein-Barr Virus DNA: A Joint Analysis of Real-World and Clinical Trial Data. *Front Oncol.* 2019;9(November):1–11.
395. Huang CL, Sun ZQ, Guo R, Liu X, Mao YP, Peng H, et al. Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load After Induction Chemotherapy Predicts Outcome in Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;104(2):355–61.
396. Liu LT, Tang LQ, Chen QY, Lu Z, Guo SS, Guo L, et al. The prognostic value of plasma Epstein-Barr viral DNA and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;93(4):862–9.
397. Zhang J, Peng H, Li WF, Zhang Y, Liu LZ, Tian L, et al. Individualized induction chemotherapy by pre-treatment plasma Epstein-Barr viral DNA in advanced nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–10.
398. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, et al. Analysis of plasma

- Epstein–Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(6):513–22.
399. Cabezas-Camarero S, Pérez-Alfayate R, Puebla F, Cabrera-Martín MN, Pérez-Segura P. Increased clinical and plasma EBV DNA responses to platinum-gemcitabine after nivolumab in patients with heavily platinum-pretreated nasopharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2020;103:14–6.
400. Fluxion Biosciences (South San Francisco, CA U. IsoFlux CTC NGS Prep Kit.
401. Nelep C, Eberhardt J. Automated rare single cell picking with the ALS cellcelector™. *Cytom Part A*. 2018;93(12):1267–70.
402. Qin J, Roughead D, Bradford A. Stabilization of Circulating Tumor Cells in Blood for up To 7 Days Using Streck Cell-Free DNA BCT®. 2017;6–7.
403. GeneRead™ DNA FFPE Handbook For purification of genomic DNA from Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. 2014;(March).
404. REPLI-g® UltraFast Mini Handbook For fast whole genome amplification from. 2011;(September).
405. QIAamp DNA Micro Handbook. 2014;(December).
406. Therascreen KRAS RGQ PCR Kit.
407. Technical sheet IDYLLA KRAS mutation test.
408. http://genomica.es/es/diagnostico_in_vitro_productos_clart.cfm. Available from: http://genomica.es/es/diagnostico_in_vitro_productos_clart.cfm
409. Mutation T, Assays D. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_095916.pdf.
410. QuantStudio™ 3D Digital PCR System User Guide. Life Technol [Internet]. 2013;1–5. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0007720.pdf>
411. QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software <https://www.thermofisher.com/account-center/cloud-login.html?samlContext=a50dd066-8dc5-4ef0-b06e-b2fb691b724c>.
412. Illumina. TruSeq® Custom Amplicon v1.5. 2013;(Figure 1):Pub. No. 770-2011-020.
413. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: Correlation with clinical and

- pathological variables. *Ann Oncol*. 2008;19(5):935–8.
414. Cabezas-Camarero S, de la Orden García V, García-Barberán V, Mediero-Valeros B, Subhi-Issa AI, Llovet García P, et al. Nasoethmoidal Intestinal-Type Adenocarcinoma Treated with Cetuximab: Role of Liquid Biopsy and BEAMing in Predicting Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy. *Oncologist*. 2019;24(3):293–300.
415. Heinemann V, Weikersthal LF Von, Decker T, Kiani A, Vehling-kaiser U, Scholz M, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1065–75.
416. Rivera F, Karthaus M, Hecht JR, Sevilla I, Forget F, Fasola G, et al. Final analysis of the randomised PEAK trial: overall survival and tumour responses during first-line treatment with mFOLFOX6 plus either panitumumab or bevacizumab in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32(8):1179–90.
417. Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(2):420–8.
418. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21.
419. Han S, Zong S, Shi Q, Li H, Liu S, Yang W, et al. Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis. *EBioMedicine* [Internet]. 2017;20:61–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.025>
420. Seeber A, Untergasser G, Spizzo G, Terracciano L, Lugli A, Kasal A, et al. Predominant expression of truncated EpCAM is associated with a more aggressive phenotype and predicts poor overall survival in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016;139(3):657–63.
421. Baumeister P, Hollmann A, Kitz J, Afthonidou A, Simon F, Shakhtour J, et al. High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome

- for Head and Neck Carcinoma. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–15.
422. Barbano R, Pasculli B, Coco M, Fontana A, Copetti M, Rendina M, et al. Competitive allele-specific TaqMan PCR (Cast-PCR) is a sensitive, specific and fast method for BRAF V600 mutation detection in Melanoma patients. *Sci Rep*. 2015;5(September):1–11.
423. Bao Y, Ching B, Mouanoutoua M, Yu W, Keys D, Desai S, et al. Cancer biomarker research using castPCR technology. Poster Present en AACR Meet 2012 (Poster 2100).
424. Chang-Hao Tsao S, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, et al. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep*. 2015;5(May):1–11.
425. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep*. 2016;6(February):1–9.
426. Hugén N, Nagtegaal ID. Distinct metastatic patterns in colorectal cancer patients based on primary tumour location. *Eur J Cancer* [Internet]. 2017;75:3–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.003>
427. Sunakawa Y, Mogushi K, Lenz HJ, Zhang W, Tsuji A, Takahashi T, et al. Tumor Sidedness and Enriched Gene Groups for Efficacy of First-line Cetuximab Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(12):2788–95.
428. Loree JM, Pereira AAL, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, et al. Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(5):1062–72.
429. Tampellini M, Ottone A, Alabiso I, Baratelli C, Forti L, Berruti A, et al. The prognostic role of baseline CEA and CA 19-9 values and their time-dependent variations in advanced colorectal cancer patients submitted to first-line therapy. *Tumor Biol*. 2014;36(3):1519–27.
430. Thomsen M, Skovlund E, Sorbye H, Bolstad N, Nustad KJ, Glimelius B, et al. Prognostic role of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in

- metastatic colorectal cancer: A BRAF-mutant subset with high CA 19-9 level and poor outcome. *Br J Cancer*. 2018;118(12):1609–16.
431. Althans AR, Brady JT, Keller DS, Stein SL, Steele SR, Times M. Are we catching women in the safety net? Colorectal cancer outcomes by gender at a safety net hospital. *Am J Surg* [Internet]. 2017;214(4):715–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2017.07.022>
432. White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston-Smith N, Crawford C, Seims A. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
433. Nicolazzo C, Massimi I, Lotti L V., Vespa S, Raimondi C, Pulcinelli FM, et al. Impact of chronic exposure to bevacizumab on EpCAM-based detection of circulating tumor cells. *Chinese J Cancer Res*. 2015;27(5):491–6.
434. Veganzones, S, De La Orden, V, Mediero, B et al. CellSearch AND IsoFlux SYSTEMS. CTC QUANTIFICATION COMPARISON. Poster Present en el 1st ACTC Adv Circ Tumor Cells Meet Oct 2016, Creta, Grecia. 2016;
435. Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12):1–22.
436. Didelot A, Le Corre D, Luscan A, Cazes A, Pallier K, Emile JF, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(3):275–80.
437. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. 2006;3(2):95–7.
438. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368–73.
439. Solassol J, Vendrell J, Märkl B, Haas C, Bellosillo B, Montagut C, et al. Multi-center evaluation of the fully automated PCR-based Idylla™ KRAS mutation assay for rapid KRAS mutation status determination on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of human colorectal cancer. *PLoS One*. 2016;11(9):1–18.
440. Colling R, Wang LM, Soilleux E. Validating a fully automated real-time PCR-based

- system for use in the molecular diagnostic analysis of colorectal carcinoma: A comparison with NGS and IHC. *J Clin Pathol*. 2017;70(7):610–4.
441. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogiannis GM, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061–8.
442. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;(481):506–10.
443. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* [Internet]. 2012;487(7407):330–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11252>
444. Gao XH, Yu GY, Gong HF, Liu LJ, Xu Y, Hao LQ, et al. Differences of protein expression profiles, KRAS and BRAF mutation, and prognosis in right-sided colon, left-sided colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
445. Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, Newberg J, Cooke M, Miller V, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun*. 2019;10:3722.
446. LZ S. No Title. *J Clin Oncol*. 2018;16((suppl; abstr e21176)).
447. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2017;19(3):341–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>
448. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2017;19(1):4–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>
449. Swanton C. Intratumor Heterogeneity : Evolution through Space and Time.

Cancer Res. 2012;72(19):4875–82.

9. ANEXOS

“del latín annexus, participio pasivo de annectere ‘enlazar, unir’

Diccionario de la Lengua Española

Real Academia Española

Tabla A1. Características basales de los pacientes con cáncer colorrectal.

VARIABLE		GRUPO 1 N=34*					GRUPO 2 N=22*				
Obstrucción		26.5%					4.8% (1/21)				
Perforación		11.8%					15% (3/20)				
Obstrucción y/o perforación		32.4% (11/34)					-				
Invasión linfovenosa		52.2% (12/23)					25% (4/16)				
Invasión perineural		40.9% (9/22)					12.5% (2/16)				
Grado		Bajo: 56.5% (13/23)	Inter- medio: 30.4% (7/23)	Alto: 13.04% (3/23)	-	-	Bajo: 35.7% (5/14)	Inter- medio: 57.1% (8/14)	Alto: 7.1% (1/14)	-	-
T al diagnóstico según AJCC 7ª Edición (2010)		TX: 6.9% (2/29)	T1: 0% (0/29)	T2: 3.4% (1/29)	T3: 62.1% (18/29)	T4: 27.6% (8/29)	TX: 5.6% (1/18)	T1: 0% (0/18)	T2: 0% (0/18)	T3: 55.6% (10/18)	T4: 38.9% (7/18)
N al diagnóstico según AJCC 7ª Edición (2010)		NX: 6.9% (2/29)	N1: 44.8% (13/29)	N2: 24.1% (7/29)	-	-	NX: 5.9% (1/17)	N1: 29.4% (5/17)	N2: 52.9% (9/17)	-	-
M al diagnóstico según AJCC 7ª Edición (2010)		MX: 0%	M0: 32.4% (13/29)	M1: 67.6% (7/29)	-	-	MX: 0% (0/21)	M0: 33.3% (7/21)	M1: 66.7% (14/21)	-	-
Localización de las metástasis al diagnóstico	Hígado	67.9% (19/28)					68.4% (13/19)				
	Pulmón	14.8% (4/27)					29.4% (5/17)				
	Ganglios linfáticos	14.8% (4/27)					29.4% (5/17)				
	Peritoneo	14.8% (4/27)					11.1% (2/18)				
	Hueso	0 (0/27)					5.9% (1/17)				
	Otra	22.2% (2/9)					25% (1/4)				
Mediana de ganglios resecados al diagnóstico (min- max) [N]		18 (0-35) [N=20 pacientes]					12 (3-46) [N=13 pacientes]				
Mediana de ganglios resecados y afectos al diagnóstico (min-max) [N]		1 (0-13) [N=22 pacientes]					4 (0-32) [N=13 pacientes]				
Tipo de cirugía de metástasis	Hepat- ectomía derecha	80% (8/10)					14.3% (1/7)				
	Hepat- ectomía izquierda	10% (1/10)					0 (0/10)				
	Segment- ectomía hepática	10% (1/10)					28.6% (2/7)				
	Metastas- ectomía hepática	0 (0/10)					28.6% (2/7)				
	Metastas- ectomía pulmonar	0 (0/10)					28.6% (2/7)				

Grupo 1: pacientes vírgenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada en el momento de extracción de CTC; **Grupo 2:** pacientes KRAS nativos en progresión a tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC. AJCC: American Joint Committee on Cancer, QT: quimioterapia, CTC: células tumorales circulantes, EGFR: epidermal growth factor receptor, - : no aplica, NOS: not otherwise specified, VEGF: vascular endothelial growth factor. *Población total de pacientes de cada grupo. Para cada variable se indica el porcentaje calculado sobre el número total de pacientes de cada grupo (Grupo 1: N=34; Grupo 2: N=22). En caso de no disponer de datos para todos los pacientes de cada grupo, se indica el porcentaje y el número exacto de pacientes en que se pudo evaluar cada variable.

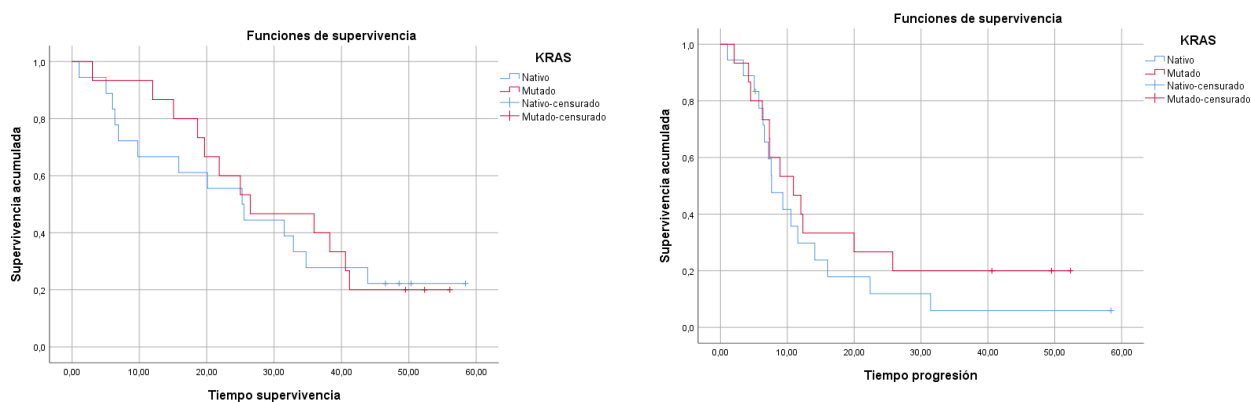


Figura A1. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del estatus de KRAS (mutado vs nativo) en los pacientes del grupo 1. No hubo diferencias estadísticamente significativas ni para la SG ($p=0.770$) ni para la SLP (0.358).

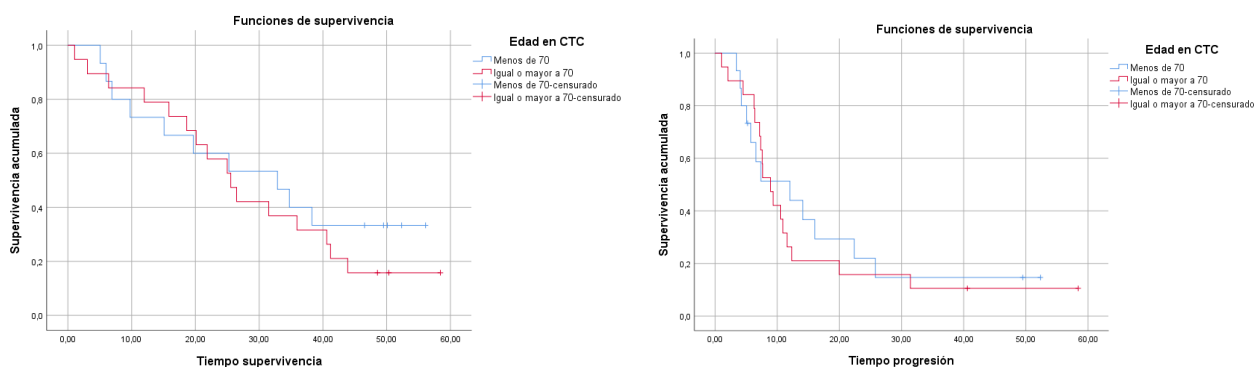


Figura A2. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función de la edad en el momento de la extracción de las CTC (<70 vs ≥ 70) en los pacientes del grupo 1. No hubo diferencias en función de la edad ni para la SG ($p=0.456$) ni para la SLP ($p=0.674$).

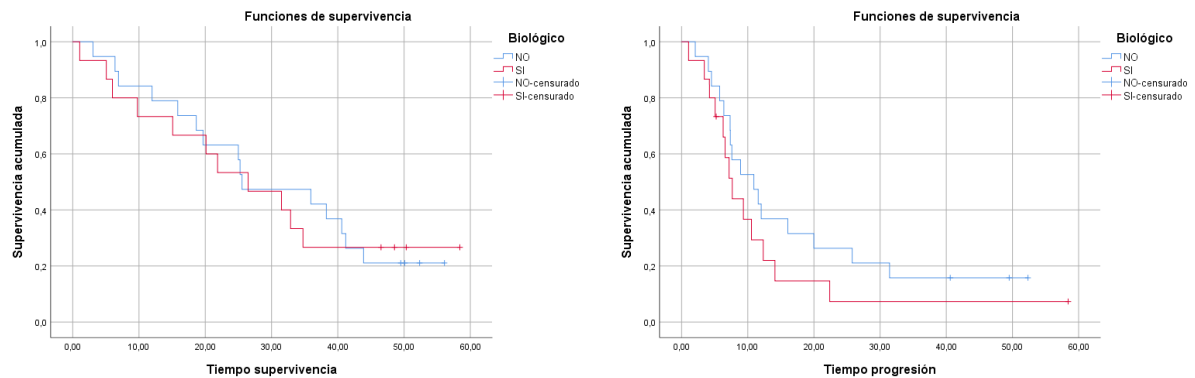


Figura A3. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función de haber recibido tratamiento biológico (anti-VEGF y/o anti-EGFR) o no, en los pacientes del grupo 1. No hubo diferencias ni para la SG ($p=0.908$) ni para la SLP ($p=0.258$).

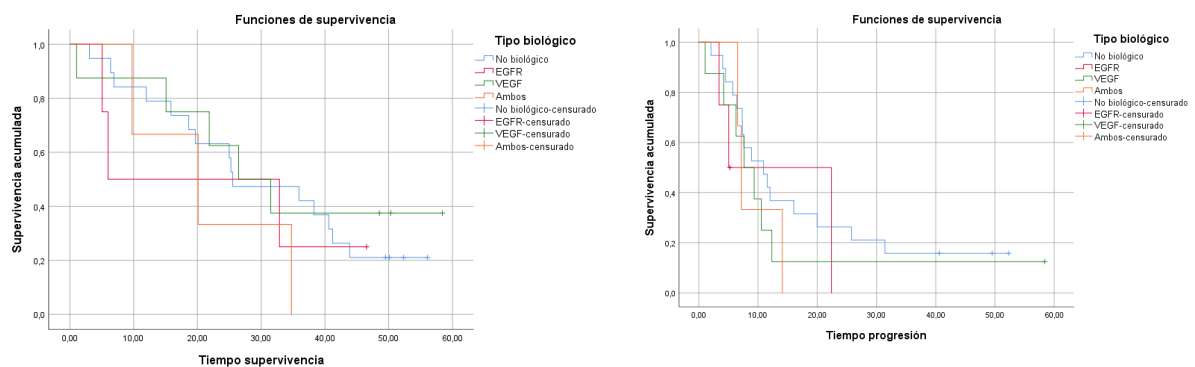


Figura A4. Supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en función del tipo de tratamiento biológico recibido, en los pacientes del grupo 1. No hubo diferencias ni para la SG ($p=0.646$) ni para la SLP ($p=0.703$).

Tabla A2. Sensibilidad, especificidad y estadístico C de Harrell para diferentes puntos de corte de CTC con CellSearch® y con IsoFlux™ en el grupo 1 (QT-naïve) con seguimiento actualizado a fecha de mayo de 2019 (mediana de seguimiento de 26 meses).

PUNTO DE CORTE DE CTC			Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	HR (95% ci)	Estadístico C
Grupo 1	CellSearch®	CTC ≥ 1	73%	25%	-0.02	1.42 (0.29-6.73)	0.50
		CTC ≥ 2	54%	63%	0.16	1.65 (0.46-5.88)	0.54
		CTC ≥ 3	31%	100%	0.31	2.77 (0.77-9.95)	0.59
		CTC ≥ 4	27%	100%	0.27	2.54 (0.62-10.35)	0.59
		CTC ≥ 5	15%	100%	0.15	2.54 (0.62-10.35)	0.59
	IsoFlux™	CTC ≥ 4	65%	38%	0.03	1.67 (0.43-6.51)	0.57
		CTC ≥ 5	58%	50%	0.08	2.37 (0.60-9.22)	0.62
		CTC ≥ 6	54%	50%	0.04	2.49 (0.64-9.65)	0.63
		CTC ≥ 9	50%	50%	0	3.01 (0.77-11.70)	0.65
		CTC ≥ 10	46%	50%	-0.04	3.01 (0.77-11.70)	0.65
		CTC ≥ 11	46%	63%	0.09	3.01 (0.77-11.70)	0.65

Los mejores puntos de corte para cada Sistema de detección de CTC se muestran resaltados en negrita. Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC.; CTC: células tumorales circulantes; QT: quimioterapia. Para más información ver texto principal.

Tabla A3. Sensibilidad, especificidad y estadístico C de Harrell para diferentes puntos de corte de CTC con CellSearch® y con IsoFlux™ en el grupo 1 (QT-naïve) a los 24 meses de supervivencia estimada.

PUNTO DE CORTE DE CTC			Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	HR (95% CI)	Estadístico C
Grupo 1	CellSearch®	CTC ≥ 1	79%	30%	0.09	1.29 (0.36-4.65)	0.51
		CTC ≥ 2	57%	55%	0.12	1.42 (0.49-4.09)	0.54
		CTC ≥ 3	29%	80%	0.09	1.46 (0.46-4.64)	0.54
		CTC ≥ 4	21%	80%	0.01	1.26 (0.35-4.51)	0.53
	IsoFlux™	CTC ≥ 4	64%	35%	-0.01	1.03 (0.35-3.09)	0.51
		CTC ≥ 5	57%	45%	0.02	1.17 (0.40-3.37)	0.53
		CTC ≥ 6	57%	50%	0.07	1.35 (0.47-3.91)	0.55
		CTC ≥ 9	57%	55%	0.12	1.57 (0.55-4.54)	0.57
		CTC ≥ 10	57%	60%	0.17	1.83 (0.63-5.28)	0.59
		CTC ≥ 11	57%	65%	0.22	2.14 (0.74-6.17)	0.61

Los mejores puntos de corte para cada Sistema de detección de CTC se muestran resaltados en negrita. Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC.; CTC: células tumorales circulantes; QT: quimioterapia. Para más información ver texto principal.

Tabla A4. Sensibilidad, especificidad y estadístico C de Harrell para diferentes puntos de corte de CTC con CellSearch® y con IsoFlux™ en el grupo 1 (QT-naïve) para la supervivencia libre de progresión.

PUNTO DE CORTE DE CTC			Sensibilidad	Especificidad	Índice de Youden	HR (95% ci)	Estadístico C
Grupo 1	CellSearch®	CTC ≥ 1	73%	25%	-0.02	0.79 (0.37-1.67)	0.56
		CTC ≥ 2	54%	63%	0.16	0.79 (0.37-1.67)	0.52
		CTC ≥ 3	31%	100%	0.31	1.19 (0.51-2.82)	0.53
		CTC ≥ 4	27%	100%	0.27	1.26 (0.51-3.13)	0.54
		CTC ≥ 5	15%	100%	0.15	2.54 (0.62-10.35)	0.59
	IsoFlux™	CTC ≥ 4	65%	38%	0.03	0.73 (0.34-1.57)	0.53
		CTC ≥ 5	58%	50%	0.08	0.78 (0.37-1.64)	0.51
		CTC ≥ 6	54%	50%	0.04	0.89 (0.42-1.89)	0.49
		CTC ≥ 7	50%	50%	0	0.81 (0.38-1.71)	0.504
		CTC ≥ 8	46%	50%	-0.04	0.81 (0.38-1.71)	0.504
		CTC ≥ 9	46%	63%	0.09	0.81 (0.38-1.71)	0.504
		CTC ≥ 10	46%	66%	0.1	0.71 (0.33-1.53)	0.53
		CTC ≥ 11	46%	70%	0.1	0.67 (0.31-1.48)	0.53
		CTC ≥ 12	42%	70%	0.1	0.58 (0.26-1.30)	0.56

Los mejores puntos de corte para cada Sistema de detección de CTC se muestran resaltados en negrita. Grupo 1: pacientes QT-naïve para la enfermedad avanzada en el momento de la extracción de CTC.; CTC: células tumorales circulantes; QT: quimioterapia. Para más información ver texto principal.

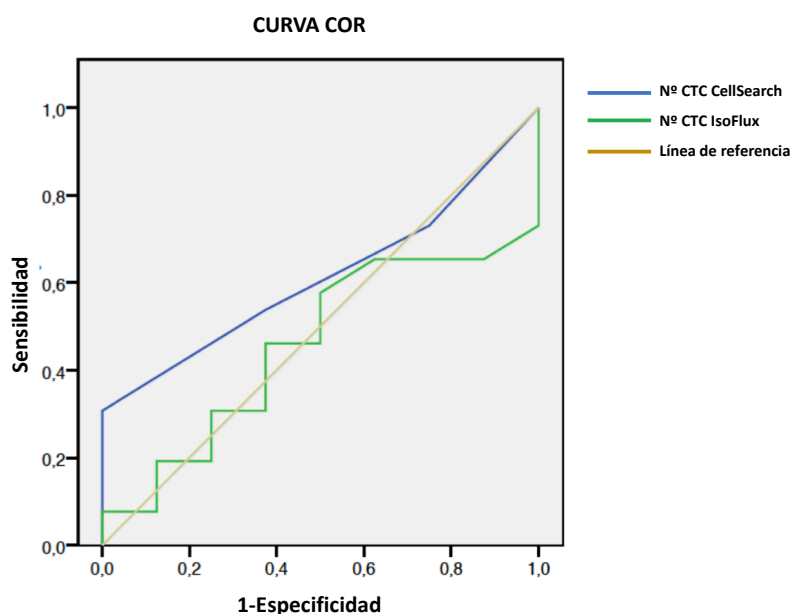
Figura A5

Figura A5. Curvas COR para la supervivencia global con cada sistema de detección de CTC en el grupo 1. Las áreas bajo la curva (AUC) para CellSearch (AUC=0.613) y para IsoFlux (AUC=0.457) fueron bajas, indicando la pobre capacidad predictiva de los dos sistemas de recuento.

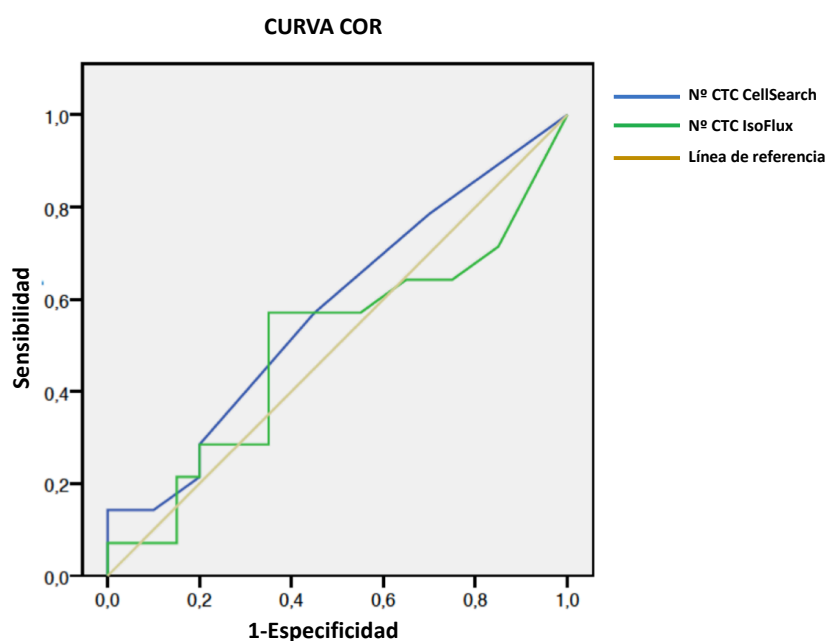
Figura A6

Figura A6. Curvas COR para la supervivencia global estimada a los 24 meses con cada sistema de detección de CTC en el grupo 1. Las áreas bajo la curva (AUC) para CellSearch (AUC=0.577) y para IsoFlux (AUC=0.500) fueron bajas, indicando la mala capacidad predictiva de los dos sistemas de recuento.

Tabla A5. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 1.

GRUPO 1	RECuento DE CTC		KRAS TUMOR		KRAS CTC [†]		
Paciente	CellSearch®	IsoFlux™	RT-PCR*	castPCR™	RT-PCR*	CLART® CMA mPCR	castPCR™
HCSC-1-01	4	36	NATa	G12D (22), G13D (34)	NATa	MI	NAT
HCSC-1-02	2	0	NATa	MI	MI	MI	MI
HCSC-1-03	78	203	NATa	G12A (22), G12S (28)	NATa	MI	G12A (17)
HCSC-1-04	2	395	NATa	G12V (17), G13D (21), G12D (22), G12C (30)	NATa	MI	G13D (31)
HCSC-1-05	0	6	G12Sb	G12S (10), G12D (17)	NATa	NAT	NAT
HCSC-1-06	0	9	G12Db	MI	NATa	NAT	G13D (18)
HCSC-1-08	1	1	G12Db	G12D (16)	NATa	NAT	G12D (25), G13D (22), G12A (30), G12S (31)
HCSC-1-09	2	60	MUTa	TP: G12V (10), G12D (15); MTX PULM: G12V (7)	NATa	MI	G13D (12)
HCSC-1-10	0	0	NATa	TP: G12S (20), G12V (25), G12D (21)	NATa	MI	NAT
HCSC-1-11	1	4	MUTa	TP1 (SIGMOIDEC): G12S (20), G13D (25, G12D (24). TP2 (ENDOSC): G12V (14), G13D (22), G12D (26), G12C (19). TP2(HEMICOLEC): (G12S (24), G12V (8), G13D (20), G12D (18) MTX HEP: G12D (21)	NATa	MI	G13D (33)
HCSC-1-12	5	48	G12Cb	TP: G12S (25), G12D (20), G12C (6) RECAÍDA LOCAL: G12S (22), G12D (21), G12C (6)	NATa	MI	NAT
HCSC-1-15	4	48	G12Db	G12S (9)	NATa	NAT	G12A (11), G13D (19)
HUPH-1-21	0	4	NATa	MI	-	MI	NAT
HUPH-1-22	0	4	MUTa	MI	NATa	NAT	NAT
HUPH-1-24	1	0	MUTa	MI	NATa	NAT	G12V (9)
HUPH-1-28	2	5	NATa	MI	NATa	MI	NAT
HCSC-1-07	0	2	MI	MI	MI	MI	MI
HCSC-1-13	1	23	G12Db	MI	NATa	MI	MI
HCSC-1-14	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI

HCSC-1-16	0	23	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-17	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-18	3	419	MUTa	MI	NATa	MUT	MI
HUPH-1-19	1	2	MUTa	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-20	2	1	NATa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-23	0	11	MUTa	MI	NATa	NAT	MI
HUPH-1-25	2	0	NATb	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-26	10	408	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-27	2	10	NATb	MI	NATa	MI	MI
HUPH-1-29	1	0	MUTa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-30	4	312	MUTa	MI	MI	MI	MI
HUPH-1-31	32	56	MUTa	MI	MI	MI	MI
HURSC-1-32	1	62	NATb	MI	NATa	MI	MI
HURSC-1-33	1	1	NATb	MI	MI	MI	MI
HURSC-1-34	0	39	NATb	MI	MI	MI	MI

ENDOSC: endoscopia; MI: no realizado por muestra insuficiente; HEMICOLEC: hemicolectomía; MTX HEP: metástasis hepática; MUT: mutado; NAT: nativo; TP: tumor primario; TP1: primer tumor primario 1; TP2: segundo tumor primario; *RT-PCR: Se emplearon Cobas (a) o TheraScreen (b) en tumor primario y Cobas (a) en CTC.

† El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema *IsoFlux*TM

Se muestran primero los casos estudiados por castPCR en CTC y a continuación los restantes.

El estudio de KRAS en Tumor, se realizó siempre en el tumor primario (TP), salvo en algún caso en que se realizó también en la metástasis o recidiva local y en cuyo caso así se especifica.

En los casos estudiados por castPCR, se especifica entre paréntesis () el dCt de la mutación concreta. Se consideran mutaciones reales aquellas con un dCt < 21. Como se explica en el texto principal, aquellas mutaciones coincidentes en varias muestras del tumor sólido o del tumor y de las CTC se consideraron como probables aunque el dCt fuera > 21.

Se resaltan en **negrita** los casos en los casos KRAS mutado en tumor sólido y CTC por cualquier técnica. Se resaltan en **rojo** los casos en que se detectó la misma mutación en tumor sólido y en CTC por cualquier técnica.

Tabla A6. Tabla resumen del recuento de CTC y estatus de KRAS en el tumor primario y CTC analizados por diferentes técnicas en pacientes del grupo 2.

GRUPO 2	RECuento de CTC		KRAS TUMOR		KRAS CTC [†]		
Paciente	CellSearch®	IsoFlux™	RT-PCR*	castPCR™	RT-PCR*	CLART® mPCR	CMA castPCR™
HCSC-2-02	0	-	NATa	NAT	NATa	-	G12S (25)
HCSC-2-03	1	-	NATb	NAT	-	-	NAT
HCSC-2-04	0	-	NATb	NAT	NATa	-	NAT
HCSC-2-05	1	-	NATa	NAT	NATa	-	NAT
HCSC-2-06	2	-	NATa	TP: G12S (21), G12A (8), G12D (18) MTX HEP: G12D (15)	NATa	-	NAT
HCSC-2-07	4	-	NATa	G12S (17)	NATa	-	G13D (28)
HCSC-2-08	1	193	NATa	TP: NAT MTX PUL: G12S (25)	NATa	-	G12A (12), G13D (33), G12D (27)
HCSC-2-09	1	296	NATa	G12S (18), G13D (18), G12D (18), G12C (15)	NATa	-	G12A (19)
HUPH-2-20	2	-	NATa	G12D (19), G12S (21), G13D (30)	NATa	-	G12A (11), G13D (12)
HUPH-2-21	17	-	NATb	-	NATa	-	NAT
HCSC-2-01	-	65	NATa	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-10	1	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-11	4	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-12	12	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-13	7	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-14	1	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-15	1	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-16	0	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-17	6	-	NATb	MI	MI	-	MI
HUPH-2-18	0	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-19	0	-	NATb	MI	NATa	-	MI
HUPH-2-22	1	-	NATb	MI	MI	-	MI

(-): No realizado; MI: muestra insuficiente; MTX PULM: metástasis pulmonar; NAT: nativo; TP: tumor primario.

*RT-PCR: Se emplearon Cobas (a) o TheraScreen (b) en tumor primario y Cobas (a) en CTC.

[†] El estudio molecular en CTC se realizó sólo en CTC recuperadas mediante el sistema *IsoFlux™*

Se muestran primero los casos estudiados por castPCR en CTC y a continuación los restantes.

El estudio de KRAS en Tumor, se realizó siempre en el tumor primario (TP), salvo en algún caso en que se realizó también en la metástasis o recidiva local y en cuyo caso así se especifica.

En los casos estudiados por castPCR, se especifica entre paréntesis () el dCt de la mutación concreta. Se consideran mutaciones reales aquellas con un dCt < 21. Como se explica en el texto principal, aquellas mutaciones coincidentes en varias muestras del tumor sólido o del tumor y de las CTC se consideraron como probables aunque el dCt fuera > 21.

Se resaltan en **negrita** los casos en los casos KRAS mutado en tumor sólido y CTC por cualquier técnica. Se resaltan en **rojo** los casos en que se detectó la misma mutación en tumor sólido y en CTC por cualquier técnica.